Geschichte der Reinkultur.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin

verfasst und einer

Hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Siegfried Simon,
approb. Arzt aus Magdeburg.

München 1907.
Kgl. Hof- und Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn

Geschichte der Reinkultur.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin

verfasst und einer

Hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Siegfried Simon,
approb. Arzt aus Magdeburg.

ACAD. MED. BAT. BIBL.

München 1907.
Kgl. Hof- und Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn.

Angenommen von der hohen medizinischen Fakultät der Universität München.

Referent: Professor Dr. Gruber.

Wir besitzen heute eine vorzügliche Methode der Reinkultur, die von Robert Koch gefunden wurde und trotz mancher kleineren Verbesserungen noch im wesentlichen die gleiche ist, wie sie von ihrem Entdecker 1881 angegeben wurde. Mit ihrer Entdeckung beginnt die rapide Entwicklung der modernen Bakteriologie; in kurzer Zeit wurden damals eine Reihe von Fragen gelöst, die trotz vielfacher Versuche in den Jahrzehnten vorher ungeklärt geblieben waren. Trotzdem wäre es falsch zu glauben, dass vorher keine Reinkulturen möglich gewesen wären. Was bis 1881 geleistet worden ist, diese verschiedenen Reinkulturmethoden bis zu ihrem Abschluss durch Kochs Entdeckung, will ich im folgenden beschreiben.

Will man eine Reinkultur anlegen, so bedarf man dazu eines sterilen Nährbodens und einer Methode, die es erlaubt, den gesuchten Spaltpilz aus dem Gemisch von Lebewesen zu isolieren, in dem er meist zu finden ist. Diese beiden Voraussetzungen sind uns heute selbstverständlich; dem war aber nicht immer so, und die Zeit liegt nicht so weit zurück, wo man wohl die Sterilisation der Nährböden, nicht aber die Isolierung der Spaltpilze durchführen konnte.

Die Fähigkeit keimfreie Nährböden herzustellen, entwickelte sich schon sehr frühzeitg in der Geschichte der Bakteriologie. Die Versuche dazu wurden unternommen, um die Generatio aequivoca zu widerlegen, sie dienten aber zugleich zur Gewinnung steriler Stoffe und führten schliesslich dazu, dass man alle organischen Substanzen unzersetzt aufbewahren konnte.

Schon die erste Arbeit auf diesem Gebiete von Spallanzani (1) zeigte, wie man Vegetabilien, Obst und Fleisch durch Kochen mit Wasser sterilisieren kann. Er kam bei seiner Arbeit, die die Theorien Needhams widerlegen sollte, schliesslich zu Versuchsanordnungen, die in den gekochten Substanzen jedes Wachstum von Organismen verhinderten. Seine Versuche waren nur zum Teil gelungen, als er verschiedene Arten von Fleisch und Gesäme nahm, sie stark sieden liess und dann in Flaschen tat, die er vorher am Feuer hinlänglich erwärmt hatte. Nach dem Erkalten und dem Eindringen frischer Luft versiegelte er die Flaschen hermetisch, aber nur ein kleiner Teil derselben zeigte keine Entwicklung von Lebewesen. Bei einer anderen, letzten Methode gelang ihm aber die Sterilisation sicher. Er brachte „19 verschiedene Infusionen in ebensoviele hermetisch versiegelte Flaschen und liess sie in einem grossem Gefässe mit Wasser eine Stunde lang kochen". Sie blieben alle unzersetzt. Bei seiner Arbeit über die Gärung, mit der er deren Abhängigkeit vom Sauerstoffzutritte beweisen wollte, kam Gay-Lussac dazu, die Möglichkeit der Sterilisation auch für Milch und Urin zu beweisen (2). „Ich glaube, dass man vegetabilische und animalische Stoffe konservieren kann, ohne sie der Berührung mit Luft zu entziehen, wenn man sie nur von Zeit zu Zeit der Temperatur des kochenden Wassers aussetzt." So sterilisierte er eine Anzahl Vegetabilien. Um Milch, Johannisbeersaft und Leimlösung vor Zersetzung zu bewahren, benützte er aber eine höhere Temperatur als die des siedenden Wassers. Die drei Substanzen wurden zu Beginn des Versuches alle Tage, später alle zwei Tage der Temperatur eines kochenden, mit Kochsalz gesättigten Wassers ausgesetzt und waren noch nach zwei Monaten vollkommen unverändert.

„Auch Urin erhält sich lange in gut verschlossenen Gefässen, wenn er möglichst wenig in Berührung mit Luft gekommen ist, er behält seine Durchsichtigkeit, Sauerkeit und

seinen Geruch und setzt kein phosphorsaures Ammonium-Magnesium ab, nur bisweilen Harnsäure.“

Die Versuche der nächsten Jahrzehnte von Schulze, Schwann, Ure und Helmholtz, so wichtig sie auch für die Generatio aequivoca-Frage waren, brachten doch keine Erweiterung der Kenntnis von den steril herzustellenden Nährböden. Mit ihrer neuen Methode der Luftfiltration gaben 1854 Schröder und von Dusch zugleich eine Übersicht der Stoffe, die man mit Hilfe des Kochens mit Wasser sterilisieren kann (3). Milch, Eigelb und Fleisch ohne Wasser liessen sich so nicht vor der Zersetzung bewahren. Schröder setzte die Versuche fort und kam 1859 dazu, Eiweiss und Eigelb, Blut und Urin zu sterilisieren, während die Experimente mit Fleisch ohne Wasser und Milch wiederum misslangen (4).

Frisches Eiweiss wurde in einem Glaskolben mit Wasser vermischt und über der Spirituslampe unter beständigem Schütteln bis zum Kochen erhitzt. Der Kolben wurde kochendheiss mit Baumwolle nur lose verstopft, so dass die Baumwolle etwa eine zollange Schicht in dem Kolbenhals bildete. Auch reines Eiweiss ohne Wasserzusatz in einem Kolben zum Gerinnen gebracht und bis zu anfangender Bräunung an der Berührungsfläche mit dem Glase erhitzt, erhielt sich unverändert, wenn der Kolben noch heiss mit Baumwolle verpfropft wurde. Eigelb, mit Wasser angerührt und gekocht, zersetzte sich, wurde es aber mit Wasser in einem Glasrohre eingeschmolzen, im Ölbade längere Zeit bis 160° C erhitzt, nach dem Abkühlen und Öffnen der Röhre in einen Kolben geleert, wieder aufgekocht und der Kolben noch heiss mit Baumwolle lose verpfropft, so unterblieb jede Entwicklung von Organismen darin. Die Milch liess sich durch Abkochen nicht sterilisieren, obwohl Schröder ihre einzelnen Bestandteile, das Caseïn, die Molken, den Zucker, einzeln für sich mit Wasser abgekocht, vor Zersetzung schützen konnte. Fleisch wurde an einem

Leinen- oder Seidenfaden in einem Glaskolben an einem darüber gebundenen Draht aufgehängt, das Dampfentwicklungsrohr eines zweiten Kolbens, in welchem Wasser zum Kochen gebracht wurde, eingeführt und das hängende Fleisch längere Zeit im Dampf gekocht, dann nach Verstopfen des Kolbenhalses mit Watte sich selbst überlassen. Nur ein Versuch gelang. Dagegen blieb frisches Hühnerblut, das mit dem Dampfrohre gekocht und koaguliert wurde, unzersetzt.

Für die Milch zeigte Pasteur 1860 die Ursache, warum sie sich bei früheren Versuchen zersetzt hatte, in den Keimen, die eine Erhitzung auf 100° mehrere Minuten aushalten (10). Wenn er Milch nicht nur drei, sondern fünf Minuten und dann immer länger kochen liess, so wurde die Zahl der Kolben, in denen Zersetzung eintrat, immer kleiner, und wenn er auf 110—112° unter $1^1/_2$ Atmosphären Druck erhitzte, so blieb die Milch stets steril. Er benutzte dazu einen Kolben, mit dessen Hals ein Platinrohr verbunden war, an dessen anderes Ende ein Glastubus ansetzte, der 40—50 cm tief in das Quecksilber einer langen Kuvette tauchte. Nach 1—2 Minuten Kochens wurde der Kolbenhals abgeschmolzen. Pasteur fand, dass die Widerstandsfähigkeit der Milch gegen das Sterilisieren auch mit der alkalischen Reaktion zusammenhängt. Machte er seine künstliche Nährlösung durch Calciumkarbonatzusatz alkalisch, so musste er sie auf 105° erhitzen, wenn er sie unzersetzt erhalten wollte.

Schröder hatte seine Versuche fortgesetzt und es gelang ihm schliesslich auch Milch und Fleisch durch Hitze zu sterilisieren (12). Fleisch mit Wasser in einer zugeschmolzenen Glasröhre im Ölbad bei 130° gekocht, blieb steril und ebenso eine andere Probe, die im Papin'schen Digestor bei vier Atmosphären Druck eine halbe Stunde lang gekocht wurde, dann wieder im Glaskolben aufgekocht und mit Baumwolle gegen Luftkeime geschützt wurde. Auch Milch bei 130° im Ölbade

im zugeschmolzenen Glasrohre oder im Digestor bei fünf, vier, drei und zwei Atmosphären Druck eine halbe Stunde gekocht und dann im mit Baumwollenpfropf versehenen Glaskolben noch einmal aufgekocht, blieb unzersetzt.

Roberts (14) hatte bei seinen Versuchen, von denen ich später noch diejenigen erwähnen werde, die sich mit der aseptischen Gewinnung der Milch befassten, auch unternommen, die Sterilisierungsmöglichkeit aller bekannteren Substanzen darzutun. Die meisten Schwierigkeiten machte ihm dabei der alkalisch gemachte Heuinfus, der noch nach einstündigem Kochen keimte und zur sicheren Sterilisation 2—3 Stunden gekocht werden musste.

Gerade an diesem am schwierigsten zu sterilisierenden Heuinfus zeigte dann Tyndall die Vorzüge einer neuen Methode, der fraktionierten Sterilisation. Wenn er den Pflanzeninfus einer wiederholten Erhitzung aussetzte auf 80—90°, so blieb er nachher dauernd steril. 1881 fand dann Koch (86) in seinem Sterilisationapparat den ja noch heute allgemein angewandten, universellen Apparat, um alle Substanzen vor Zersetzung zu bewahren. Wenn ich jetzt die geschilderten Versuche einer Kritik unterziehe, so zeigt sich, dass Spallanzani bereits über genügend Sicherheit verfügte, um mit seiner einfachen Methode alle durch die Siedehitze zu sterilisierenden Substanzen vor Zersetzung zu bewahren. Für diejenigen, die dazu einer höheren Temperatur bedürfen, brauchte man andere Methoden. Das wurde erst später erkannt, denn das mehr zufällige Ergebnis Gay-Lussacs kommt nicht dafür in Betracht, da er, von seiner „Sauerstoff-Theorie“ eingenommen, die wirkliche Ursache für das Sterilbleiben der Milch nicht fand. Erst Pasteur zeigte in klarer und eindeutiger Weise den Vorzug der höheren Temperatur und erreichte seine Erfolge durch einen recht einfachen Apparat. Auch Schröder fand schliesslich nach einer Anzahl misslungener Versuche in der Temperatur

über 100° ein Mittel zur sicheren Sterilisation und in dem Erhitzen im Ölbade und im Papin'schen Topf zwei sichere und einfache Methoden dafür. Für uns kommen heute von den beschriebenen Methoden und Apparaten für den Gebrauch nur mehr der Koch'sche und der Papin'sche Topf in Betracht und für solche Stoffe, die die Siedehitze nicht ohne Zersetzung aushalten, die fraktionierte Sterilisation.

Teile des tierischen und pflanzlichen Organismus unterliegen keiner Zersetzung, wenn sie aseptisch gewonnen werden. So kann man ohne Erhitzung dieser leicht zersetzlichen Substanzen einen sterilen Nährboden gewinnen. Da die Feststellung dieser Tatsache für die Frage nach der Generatio aequivoca eine grosse Rolle gespielt hat, so finden wir schon frühzeitig Versuche lebendes Gewebe aseptisch zu erhalten.

Der erste Versuch wurde von Gay-Lussac bei seinen schon erwähnten Untersuchungen gemacht, die den Sauerstoff als Ursache aller Zersetzungen zeigen sollten. Der Versuch ist allerdings mehr anti- als aseptisch, da er Quecksilber als Abdichtung gegen die Luft benutzte. In eine Glasglocke brachte er kleine, unverletzte Weintrauben, stürzte sie unter Qecksilber um, füllte die Glocke fünfmal nacheinander mit Wasserstoff, um alle Luft zu verdrängen, und zerdrückte die Trauben mit einem Eisenstifte. Dann wurde der Saft bei 15—20° aufbewahrt, ohne zu gären.

Auch der nächste Versuch, der im Jahre 1857 (12) von van den Broek unternommen wurde, ist nicht einwandfrei, da er gleichfalls über Quecksilber auffing, und die pflanzlichen und tierischen Flüssigkeiten, die er unzersetzt aufbewahrte, weniger durch die Asepsis als durch das aufgenommene Queckvor den Keimen geschützt blieben. Im übrigen hatte er eine recht einfache Methode.

Eine Anzahl kleiner Medizingläser wurde mit Quecksilber gefüllt, im Sandbade bis etwas unter dem Siedepunkt des Quecksilbers erhitzt, von Zeit zu Zeit unter den Rezipienten einer Luftpumpe gebracht und während des Auspumpens in Erschütterung gehalten, bis keine Luftblase mehr sichtbar war. Dann wurden sie in vorher fast bis zum Sieden erhitztem Quecksilber umgestürzt und in dieser Lage befestigt. Reife, unversehrte Trauben wurden eine nach der anderen unter dem Quecksilber mit einem erhitzten Messer angeschnitten und durch Drücken wurde der Saft heraus- und in die Gläser getrieben. Ebenso wurden Eier mit einer erhitzten eisernen Klinge eröffnet, im Inneren herumgerührt und Eiweiss und Eigelb in den Gläsern aufgefangen. Die Gallenblase und Harnblase, im Tierkörper sofort nach dem Tode unterbunden, unter Quecksilber getaucht und perforiert, entleerten ihren Inhalt gleichfalls unzersetzt in solche Gläser. Um Blut zu gewinnen, wurde ein vorher erhitztes dünnes, kupfernes Röhrchen in die Carotis eines Hundes eingeführt und mit einem Kautschukschlauch verbunden, durch den vorher während einiger Zeit Wasserdampf gestrichen war und in den die während des Erkaltens eintretende Luft nur durch ein Baumwollfilter gelangen konnte. Dann wurde das Ende des bis dahin verschlossenen Schlauches unter Quecksilber gebracht, geöffnet, das Blut nach Beseitigung einer Ligatur an der Arterie aufsteigen gelassen und in den Gläsern aufgefangen.

Der erste, der wirklich aseptisch Flüssigkeiten des tierischen Körpers zu gewinnen verstand, war Pasteur, (11) der 1863 Blut und Urin so erhielt, ohne dass er von den ähnlichen Versuchen van den Broeks wusste.

Er verband den Hals eines etwas Wasser enthaltenden Kolbens durch einen Kautschukschlauch mit einem Messingrohr, welches in der Mitte durch einen Hahn verschliessbar war, und dieses mit einem zum Glühen erhitzten längeren

Platinrohr. Durch Kochen des Wassers wurden alle Keime getötet. Bevor der Kolben ganz erkaltet war, wurde der Hahn geschlossen, das Messingrohr vom Platinrohr getrennt und das Ende des ersteren, nach nochmaliger Erhitzung, in die Vene oder Arterie oder in die Urethra eingeführt und nach Öffnen des Hahnes Blut oder Urin in den Kolben aspiriert. Dieser Versuch Pasteurs ist sehr wichtig, denn er kam auf ihn zurück, als er 1877 daran ging, mit Hilfe von Blut Reinkulturen vom Milzbrandbazillus anzulegen.

Der erste, dem es gelang, Fleischstücke ohne Erhitzen unzersetzt aufzubewahren, war Rindfleisch. (13) Zuerst unternahm er Versuche im kleinen Masstabe. Auf eine Glastafel von der Grösse eines Objekttisches kittete er ein gereinigtes, quadratisches Stück eines Objektträgers auf. Diesen Apparat reinigte er vor dem Gebrauch durch Abputzen, mehrstündiges Einlegen in Alkohol und Abbrennen des Alkohols über einer Gasflamme. Messer, Pinzetten und sonstige metallene Utensilien wurden vor dem Gebrauch geglüht und in absolutem Alkohol gekühlt. Von einem frisch getöteten Tiere wurde die Haut abskalpiert und aus der Tiefe der auf diese Weise ohne Instrumente blossgelegten Muskulatur das Fleisch für den Versuch entnommen und mit einem kleinen Tropfen Wasser auf die Mitte des Objektträgers gebracht. Das Deckglas mit sehr niedrigen Wachsfüssen wurde aufgelegt und mit Wachs befestigt, das Ganze in eine Recklinghausensche feuchte Kammer gebracht, die aber auf folgende Weise modifiziert war: Ein breiter Streifen Filtrierpapier bedeckte den Hauptobjektträger und hatte einen Ausschnitt für den kleineren, aufgekitteten eigentlichen Objektträger und an der Seite eine Verlängerung, mit der er in ein nebenstehendes, bis zum Rande gefülltes Glas Wasser tauchte. Das Wasser durchdrang von hier aus das ganze Fliesspapier und hinderte die Austrocknung unter dem alsdann aufgesetzten Glaszylinder, in den der Tubus von

oben luftdicht eingeschoben wurde. Unten, wo der Glaszylinder auf dem Filtrierpapier aufstand, war der Verschluss nicht hermetisch, aber die hier eintretende Luft war mit Wasserdampf so sehr gesättigt, dass sie das Präparat nicht austrocknen konnte. Da Rindfleisch fand, das gekochtes Wasser nicht genügend rein für seine Zwecke war, nahm er eine gereinigte, mit Alkohol abgebrannte, wieder abgekühlte Glasscheibe und hielt sie über die Öffnung eines mit leise kochendem Wasser gefüllten Gefässes. Die kleinen Tropfen, die sich auf ihr kondensierten, wurden zu einem grösseren mit Hilfe einer ausgeglühten Platinschlinge vereinigt und dieser dann zur Benetzung des Muskelstückes benutzt. Um grössere Präparate zu konservieren, reinigte Rindfleisch kleine Flaschen mit plattem Boden und 1,5 cm weitem Halse mit absolutem Alkohol und Ausbrennen und befestigte sie je auf einer langen Stange, so dass sie die äusserste Spitze des Ganzen bildeten. Auf den Flaschenboden kam ein kleines Stück Muskelfleisch, dann wurden die Stangen auf dem Dache des Hauses aufgestellt. Die Flaschen blieben einige Tage offen, erst später wurden sie mit sterilen Glasschalen bedeckt. Ausser einigen Penicillium-Kolonien nach einigen Tagen zeigten sich keine Lebewesen. Rindfleisch hatte diesen Versuch unternommen, da er glaubte, dass keine Bakterien in der Luft wären. Derartige Versuche, Teile des Tierkörpers unter aseptischen Kautelen unzersetzt aufzubewahren, wurden in der Folgezeit noch oft wiederholt und auch oft mit Erfolg.

1874 gelang es Roberts (14) Milch steril zu gewinnen. Ein Kapillarrohr wurde in den Milchgang der Zitze einer Kuh hinaufgeführt und mündete mit dem anderen Ende in ein Probierröhrchen durch einen Wattepfropf hindurch. Dieses mit dem Wattepfropf und das Kapillarrohr waren vorher zusammen erhitzt und das freie Ende des letzteren bis zum Gebrauch durch eine ebenfalls miterhitzte Wattekappe ge-

schützt worden. Trotzdem gelangen von zehn Versuchen nur drei.

Etwas bessere Erfolge erzielte Lister. (15) Nach einer Anzahl vorausgegangener vergeblicher Versuche liess er die Kuh ins Freie bringen, der Melkerin sich die Hände sowie der Kuh die Euter mit Wasser abwaschen und das Melken so ausführen, dass die Zitze nicht ausgestreift sondern ausgedrückt wurde und so am Ende frei von Berührung blieb. Die zuerst ausfliessende Milch diente zum Ausspülen des Orificiums, dann erst wurde aufgefangen und zwar ummittelbar am Zitzenende in zwei durch Gummischlauch verbundene Glasröhren, von denen die obere, weitere als Reservoir, die untere, enge als Abflussrohr diente. Die Glasröhren waren durch Erhitzen, der Schlauch durch Auskochen gereinigt und erste bis zum Gebrauch durch Kappen an den Enden vor Staub geschützt. Die Milch wurde von ihnen in vorher ausgeglühte, bedeckt gehaltene Probierröhrchen gelassen.

Als Nährböden sind in den ersten Zeiten, bis man erst die Wichtigkeit besonderer Nährböden für die verschiedenen Arten kennen lernte und den verschiedenen Einfluss verschiedener Substanzen auf das Wachstum, die verschiedensten flüssigen Pflanzenabkochungen und tierischen Flüssigkeiten verwendet worden. Wer jeden einzelnen dieser zahllosen Nährböden nun zuerst gebraucht hat für Kulturzwecke ist nicht möglich festzustellen und wohl auch wenig wichtig. Von grossem Interesse ist es dagegen, der Verwendung der festen Nährböden nachzugehen wegen ihrer Wichtigkeit für die darauf aufgebauten Reinkulturmethoden.

Koch führte durch seine Methoden 1881 den Gebrauch der festen durchsichtigen Nährböden zwecks Reinkultur in die Bakteriologie ein; er selber verwandte schon die Kar-

toffel, die Gelatine, Blutserum und die verschiedenen, bis dahin gebrauchten flüssigen Nährböden, die er durch Zusatz von Gelatine fest machte. Es sind nun schon lange vor Koch diese festen Nährböden zu Kulturzwecken gebraucht worden, ohne dass sich aber die Forscher, die es taten, darüber klar wurden, warum denn eigentlich ihre Kulturen auf diesen Nährböden gelangen und nicht in Flüssigkeiten. Bei den meisten dieser Experimente wurden die Nährböden nicht einmal steril gemacht. So lassen sich also diese Kulturversuche auf festen Medien in der Zeit vor Koch in keiner Weise mit dessen Methode vergleichen, aber es ist doch wichtig, von ihnen Kenntnis zu nehmen.

Zum ersten Male findet sich Gelatine 1851 als Nährboden in einer Arbeit Vittadinis erwähnt,(16) der bei der Untersuchung des Muskardinepilzes diesen auf mancherlei Substanzen zu kultivieren versuchte, auch auf halbflüssigen, und fand, dass er auf Lösungen von Gummi, Zucker, Mannit und Fischleim sehr schnell alle Entwicklungsformen durchläuft. Später wurde dann die Hausenblasengallerte von Klebs, die Gelatine von Brefeld ziemlich gleichzeitig für ihre Kulturen verwandt. Die Gründe, die beide dazu führten, werde ich später bei Beschreibung ihrer Reinkulturversuche angeben. Klebs beanspruchte gegenüber Koch gewisse Prioritätsrechte, aber auch er dachte niemals an die isolierende Wirkung der festen Nährböden, benützte er doch die Hausenblasengallerte nur in der Kammer, um die Entwicklung seiner Pilze zu studieren, die er durch fraktionierte Kultur bereits reingezüchtet zu haben glaubte. Dann wäre noch Miquel zu erwähnen unter denen, die selbständig zur Verwendung der Gelatine kamen, aber sie war ihm nur ein Nährboden wie andere, so z. B. bei der Kultur des Bacillus ureae,(17) und wie wenig sich das mit Kochs Methode vergleichen lässt, ergibt sich wohl am besten aus einer Bemerkung, die

er noch 1886 machte,(18) wo er schreibt, dass man die zu untersuchenden Flüssigkeiten den halbflüssigen Nährböden, den leicht schmelzbaren Fleischbrühegallerten zumischen könne, um darin die Kolonien sich entwickeln lassen zu können; er habe diese Methode auch schon seit langem benützt, müsse aber eingestehen, dass sie ihm grundschlecht erscheine, da die Gelatine gewöhnlich von Schimmel befallen und oft zum Teil oder ganz verflüssigt wurde, sogar bevor eine Bakterienkolonie Zeit hatte, auf dem Substrate zu erscheinen. Von Gravitz wurden die Brefeldschen Methoden bei seinen Arbeiten benutzt und dabei auch feste Nährböden durch Gelatinezusatz.(19)

Koch hatte die Kartoffel als Nährboden im Cohnschen Laboratorium kennen gelernt, aber auch hier hatte dieses bequeme Mittel zur Kultur nicht zum ersten Male gedient. Es ist merkwürdig, dass der Spaltpilz, der die ersten Versuche zur Reinkultur veranlasste, Monas prodigiosa, auch zur Benützung der meisten festen Nährböden führte. Bereits von ihrem Entdecker, Ehrenberg, wurde sie mit Erfolg auf Kartoffeln, Schweizerkäse und Weissbrot 1848 „okuliert". (20) Dabei gibt er an, dass auch schon der erste wissenschaftliche Beobachter des Phänomens des Rotwerdens der Speisen, Sette, Medico-Chirurg zu Pavia, später in Venedig Übertragungsversuche anstellte.(21) Freilich hat Sette die roten Flecke für den Vegetationsprozess einer noch unbekannten, staubigen Byssusart angesehen und auch mit seiner späteren Erklärung, dass es eine neue Pilzart sei, zoo-galactina imetrofa (zu deutsch: zackiger Schleim, auf Speisen sitzend), nicht das Richtige getroffen. Fresenius berichtete dann gleichfalls von dem Rotwerden der Speisen durch Monas prodigiosa, übertrug sie, wie Ehrenberg, auf Kartoffeln und beobachtete noch ein anderes Pigmentbakterium von fast gleicher Form, das gelbe und weisse Flecke auf Kartoffeln

verursachte.(22) Im Jahre 1866 kam eine Veröffentlichung(23) von O. Erdmann heraus, in der er seine Kulturversuche mit Monas prodigiosa beschrieb. Seine Arbeit war dabei auf rein chemische Ergebnisse gerichtet, denn er wollte die Natur des Farbstoffes feststellen, und wenig auf bakteriologische und kann als eine Reinkultur ebenso wenig angesehen werden, als die seiner Vorgänger, sie ist aber bemerkenswert durch die Vielseitigkeit der festen Nährböden, von denen er geronnenes Blutserum als erster verwandte. Es gelangen ihm Kulturen auf einer Semmel, auf dem Eiweiss eines weich gekochten Hühnereies, auf dem Serum von frischem Pferdeblute, das er im Wasserbade zum unvollkommenen Gerinnen gebracht hatte, auf Roggenbrot, Kartoffeln und gebratenem Fleische, während ihm die in Flüssigkeiten angelegten, wie in nicht geronnenem Serum, Milch und Leim sowie auf Käse misslangen. Im Laufe der Zeit gingen alle Kulturen zu Grunde durch Verunreinigungen mit Schimmelpilzen und Fäulniserregern, da er sich weniger bemühte, den Erreger des Farbstoffes kennen zu lernen, als die Zusammensetzung des letzteren. Endlich sind noch die Arbeiten über Pigmentbakterien im Cohnschen Laboratorium zu nennen, bei denen gleichfalls Kartoffeln und andere feste Nährböden Verwendung fanden; die von Schroeter werde ich später beschreiben, ganz ähnlich waren auch die von Cohn selbst,(24) Wernich(25) und Neelsen.(26) Auch H. Hoffmann hatte bei seinen Kulturen Kartoffeln, Brot und Schafkot als Nährboden gebraucht.

Der erste, der einen künstlichen Nährboden hergestellt hat, ist Pasteur. Schon seit 1857 hatte er sich aus Zucker und den in siedendem Wasser löslichen Bestandteilen der Bierhefe eine Nährlösung hergestellt, die er mit Kreide neutralisierte.(6) 1858 nahm er eine Lösung von Ammoniumtartrat mit dem Bierhefenabsud oder einem Pflanzensaft als

Nährlösung für das Weinsäuregärungsferment.(7) 1859 stellte er dann zum ersten Male eine vollständig künstliche Nährlösung ohne irgend einen Zusatz von Pflanzen- oder Tiereiweiss her,(9) die aus Wasser 100, Kandiszucker 10, Ammoniumtartrat 0,2—0,5, Bierhefenasche 0,1 und für Gärungserreger noch aus 3—5 g Calciumcarbonat bestand. Dies ist eine recht wichtige Tatsache, denn so wurde es in der Folgezeit möglich, die Nährböden nach Belieben zu variieren und so ihren Einfluss zu studieren auf Wachstum und viele andere Eigenschaften der Bakterien. Diese „Pasteursche Lösung“ wurde auch vielfach benutzt und auch bald allerlei Umänderungen unterzogen. So suchte 1869 A. Mayer(87) die Bierhefenasche durch ihre chemischen Bestandteile einzeln zu ersetzen und kam zu einer Lösung von Wasser = 100, Zucker = 15, $(NH_4)NO_3 = 1$, $KH_2PO_4 = 0{,}5$, $Ca_3P_2O_8 = 0{,}05$, $MgSO_4 = 0{,}25$ als beste für Sprosspilze. F. Cohn liess aus dieser Lösung den Zucker fort und meinte dann einen für Bakterien geeigneten Nährboden zu haben.(88) Am eingehendsten beschäftigte sich Naegeli mit dem Einfluss des Nährbodens auf das Wachstum. In den Jahren 1868—76 stellte er eine grosse Anzahl Experimente an über die Ernährung der niederen Pilze durch Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen.(35) So konnte er eine Reihenfolge der stickstoff- und kohlestoffhaltigen Substanzen zusammenbringen, geordnet nach der Nahrhaftigkeit. Er zeigte die Möglichkeit, schon durch die Art des Nährmediums eine der drei konkurrierenden Pilzgattungen zu begünstigen und die beiden anderen zu unterdrücken und stellte fest, dass die niederen Pilze viel weniger Mineralstoffe nötig haben als die höheren Pflanzen. Dann untersuchte er die bekannten künstlichen Nährlösungen auf ihre Mängel und gab selbst eine Reihe von Rezepten: Für Spaltpilze, die neutrale Reaktion nötig haben, empfiehlt sich folgende Mischung:

A. K_2HPO_4 ·· 0,1035 g + $MgSO_4$ ·· 0,016 g + K_2SO_4 ·· 0,013 g + $CaCl_2$ ·· 0,0055 g auf 100 g Wasser und 1 g weinsaures Ammonium. Später wurde diese Mischung verändert zu:

B. K_2HPO_4 ·· 0,1 g + $MgSO_4$ ·· 0,016 g + $(NH_4)_2SO_4$ ·· 0,017 g + $CaCl_2$ ·· 0,0055 g und schliesslich vereinfacht zu:

C. K_2HPO_4 ·· 0,1 g + $MgSO_4$ ·· 0,02 g + $CaCl_2$ ·· 0,01 g.

„Alle drei Mischungen sind gleich gut. Ist sauere Reaktion zulässig oder wünschbar, so nimmt man:

D. KH_2PO_4 ·· 0,1 g + $MgSO_4$ ·· 0,02 g + $CaCl_2$ ·· 0,01 g.

Die Normalflüssigkeit für Spaltpilze bei Anwendung eines Ammoniumsalzes ist demnach übereinstimmend mit C.:

I. Wasser 100 ccm, weinsaures Ammonium 1 g, K_2HPO_4 · 0,1 g, $MgSO_4$ · 0,02 g, $CaCl_2$ · 0,01 g. Hierin kann weinsaures Ammonium durch gleiche Mengen von essigsaurem, milchsaurem, zitronensaurem, bernsteinsaurem u. s. w. Ammonium oder von Asparagin, Leucin u. s. w. ersetzt werden. Bei Verwendung von besseren kohlen- und stickstoffhaltigen Nährsubstanzen ist es zweckmässig, die Mineralstoffe zu vermehren. Als Normalflüssigkeit für Spaltpilze können noch folgende zwei gelten:

II. Wasser 100 ccm, Eiweisspepton (oder lösliches Eiweiss) 1 g, K_2HPO_4 · 0,2 g, $MgSO_4$ · 0,04 g, $CaCl_2$ · 0,02 g.

III. Wasser 100 ccm, Rohrzucker 3 g, weinsaures Ammonium 1 g, K_2HPO_4 · 0,2 g, $MgSO_4$ · 0,04 g, $CaCl_2$ · 0,02 g.

Statt weinsaurem Ammonium kann die gleiche Menge eines anderen organischen Ammoniumsalzes oder 0,5 g Ammoniumnitrat oder 0,7 g Asparagin oder 0,4 g Harnstoff dienen. Da Krankheitspilze besser in verdünnteren Lösungen als in II. und III. gedeihen, sind die Gewichtsmengen daher auf $^2/_3$—$^1/_2$ für 100 ccm besser herabzusetzen, andere Spaltpilze leben wieder besser in konzentrierten Lösungen.“

Von Fitz und Buchner wurde, wie ich das später bei ihren Reinkulturversuchen schildern werde, eine Fleisch-

extraktlösung mit Zucker- oder Glyzerinzusatz als gutes Nährmittel ausprobiert für ihre rein zu kultivierenden Bakterien.

Einen endgültigen Abschluss erhielten alle diese Versuche erst viel später, 1893, als es Uschinsky zum ersten Male gelang, auch für pathogene Bakterien eine künstliche, eiweissfreie Nährlösung herzustellen(89) aus Wasser = 1000, Glyzerin = 30—40, NaCl = 5—7, $CaCl_2$ = 0,1, $MgSO_4$ = 0,2—0,4, K_2HPO_4 = 2,0—2,5, Ammonium lacticum = 6—7 und Natrium asparaginicum = 3—4.

Während man in Deutschland bis zur Mitte der siebziger Jahre von den Spaltpilzen noch keine Reinkultur hatte ausführen können und auch die Versuche dazu in Frankreich erst einige Erfolge gezeitigt hatten, war das Wissen von den Spross- und Fadenpilzen und die Fähigkeit, sie reinzuzüchten, bedeutend grösser. Freilich ist das ja auch recht verständlich, wenn man bedenkt, dass die Sporen von vielen unter ihnen infolge ihrer beträchtlichen Grösse leicht zu isolieren sind, sowie dadurch, dass sie in der Luft ausserhalb des Nährbodens gebildet werden, und dass durch ihre im Vergleich mit Spaltpilzen langsame Vermehrung die Schwierigkeiten der Beobachtung, besonders der fortgesetzten, bedeutend geringer sind. Waren die ersten Ansätze zu einer Reinkultur auch noch recht primitiv und daher oft auch mit Irrtümern verknüpft, so entwickelte sich doch bald ein System daraus, das durch Brefeld vervollkommnet wurde und allen Ansprüchen bei der Kultur dieser Pilze genügte.

Der erste, der mit grösseren Arbeiten auftrat, war Th. Bail.(27) Seine botanischen Forschungen führten ihn zum Studium der Bierhefe, die er nun in sterilisierten Nährlösungen, besonders Bierwürze, zog. Er nahm zur Aussaat

gewöhnliche käufliche Bierhefe, und es ist daher nicht verwunderlich, wenn er noch allerlei anderes ausserdem wachsen sah. Freilich schloss er dann auch irrtümlicherweise, dass es aus der Hefe gewachsen sei. Da er sich gegen Infektion seiner Kulturen durch Luftkeime nicht schützte, so hatte er hierin eine weitere Fehlerquelle. So glaubte er 1857 den Übergang von Penicillium glaucum und Mucor in Hefe bewiesen zu haben und stellte auch sogleich dafür eine passende Theorie auf, indem er sagte, dass „die Würze oder überhaupt die gärungsfähigen Flüssigkeiten Pilzzellen individualisieren und den gewöhnlichen Keimungsakt vieler Fortpflanzungsorgane zur Sprossung modifizieren, oder, was dasselbe heisst, zur Hefenbildung". Da er aber trotz seiner unkritischen Methoden ein geschickter Beobachter war, so fand er doch die Sprossform des Mucor mucedo, er beobachtete richtig, dass Mucor, in gärungsfähigen Flüssigkeiten untergetaucht, sich durch Sprossung vermehrt und alkoholische Gärung verursacht, auch die Verschiedenheit von Mucorhefe und Bierhefe wurde von ihm festgestellt, fälschlicherweise aber auch der Übergang der beiden ineinander und die Tatsache, dass die Bierhefe nur ein Entwicklungszustand des Mucor mucedo sei. Zur dauernden Beobachtung unter dem Mikroskope bediente er sich bereits damals eines einfachen Apparates: Ein langer Faden geht vom Gefässe mit Nährlösung auf den Objektträger und dicht um das den zu beobachtenden Organismus bedeckende Deckgläschen herum. So wird zugleich stets frische Nahrung zugeführt und das Präparat fixiert. Infolge seiner mangelhaften Methode kam Bail später auch dazu, die Verwandlung einiger Tierparasiten, zum Beispiel Empusa muscae, in Mucor mucedo festzustellen.

Ungefähr gleichzeitig mit Bail kam H. Hoffmann zu ähnlichen Resultaten. (28) Er stellte zwar strengere Ansprüche an die Reinheit der Kulturböden, aber bei der Aus-

saat war er ebenso kritiklos. Sein Apparat für Hefezucht, Dunstrohr zur Reinkultur von ihm genannt, ein Reagensrohr, in dem bis zur Hälfte Wasser eingefüllt und eine Viertelstunde gekocht war, wurde mit einem Stück Kartoffel, Schafkot oder Brot versehen; dann wurde abermals gekocht, das Wasser abfliessen gelassen und der Apparat nach dem Erkalten mit einer langen Nadel mit einer Spur frischer Hefe beschickt. Aber diese Hefe brachte zugleich eine Menge anderer Keime mit sich und führte Hoffmann zu dem Irrtum, dass Faden- und Sprosspilze Entwicklungsformen einer Art seien. Von den in dem Reagensrohr entwickelten Sporen wurden dann Übertragungen in den Gärapparat ausgeführt. Dieser war ein Reagensrohr, das mit siedendem Honigwasser gefüllt und mit einem von einer engen Glasröhre durchbohrten Korke verschlossen wurde. Nach einigen Minuten Kochens und nach dem Erkalten brachte er seine angeblich reinen Sporen hinein, verschloss wieder, drehte das Gefäss um und stellte es in abgekochtes Honigwasser, um die Gärung vor sich gehen zu lassen.

Während die Versuche von Bail und Hoffmann nur geringe Erfolge aufzuweisen hatten, waren zur selben Zeit Tulasne und de Bary zu Methoden gekommen, die zwar primitiv und auch noch mit Fehlerquellen behaftet waren, aber doch die Grundlage bildeten für die späteren Arbeiten, die zur Reinkultur der Spross- und Fadenpilze führten.(29, 30) Sie beginnen mit dem Einfachsten: Sporen in einem Wassertropfen auf dem Objektträger unter dem Mikroskope auskeimen zu sehen. Als ihm dies bei anspruchsvolleren Keimen oder bei länger dauernden Beobachtungen nicht mehr genügte, ersetzte de Bary den Wassertropfen durch einen Tropfen Nährflüssigkeit; so brachte er die Sporen von Exoascus Pruni und viele andere in nicht zu konzentrierter Zuckerlösung zum Keimen und verwandte auch andere Nährlösungen.

Mehr als Massenkulturen sind die Versuche Vittadinis zu betrachten,(16) der in einer grossen Zahl von flüssigen und halbflüssigen Nährböden den Muskardinepilz rein zu ziehen versuchte und die wegen der ersten Verwendung der Gelatine dabei beachtenswert sind. Derartiger, wohl fast stets unreiner Massenkulturen liessen sich eine grosse Menge anführen. Die ersten liegen weit zurück und die Kultivierungsversuche an Schimmelpilzen und Hefe sind so zahlreich unternommen, dass ich sie hier nicht anführen kann, besonders, da von einer wirklichen Reinkultur niemals dabei gesprochen werden kann. Dann lässt sich auch schwer eine Grenze ziehen gegen die grösseren dieser Pflanzen, deren Sporen, schon makroskopisch sichtbar, zu züchten wohl gleichfalls nicht mehr unter die Aufgaben der bakteriologischen Reinkultur fällt. Es möge genügen, wenn ich berichte, dass die meisten bekannteren Botaniker bis auf Micheli und Persoon zurück Fadenpilze aus ihren Sporen zu ziehen versuchten und dass die ersten Massenkulturen, die wirklich Reinkulturen genannt werden können, von Pasteur ausgeführt wurden; sie werde ich später beschreiben. Auch Naegeli trat sehr frühzeitig mit derartigen Kulturen hervor.(31) Er erhielt 1868 bereits reine Schimmelvegetationen, indem er ein bei 120° sterilisiertes, mit Nährflüssigkeit bedecktes und mit einer Blase zugebundenes Glas benutzte, auf die Blase Schimmelsporen streute und nur so lange sie durch Bedecken mit einer Glasglocke feucht hielt, bis die Schimmelfäden durch die Blase hindurch und längs der Glaswandung in die Flüssigkeit hinunter gewachsen waren. Auch ein Baumwollpfropf statt der Blase liess sich verwenden. Er benützte dann, wie Pasteur, die Gärtätigkeit eines Pilzes, die sein Wachstum befördert, aber die Ernährung und Vermehrung der übrigen Pilze benachteiligt, um durch einige aufeinander folgende Züchtungen die Mitbewerber vollkommen zu verdrängen.

Rein kultiviert und in ihren Lebensbedingungen auf den verschiedenen Nährböden untersucht hat 1870 M. Reess die verschiedenen Saccharomyces-Arten.(32) Er führte Kulturen auf Flüssigkeiten und auf frischen und gekochten Kartoffelscheiben, Kohlrabi, Topinamburknollen und Möhren aus, stellte die Askosporenbildung und die Bedingungen dafür fest und zog die verschiedenen Varietäten des Saccharomyces cerevisiae und vini sowie Mycoderma vini rein. Für die Reinkultur mit fortlaufender Beobachtung unter dem Mikroskop, auf deren Geschichte ich allein ausführlicher eingehen will wegen der Beziehungen zu den recht ähnlichen Versuchen zur Spaltpilzkultur, wurden nach den noch primitiven Methoden von de Bary und Tulasne die Arbeiten von Brefeld und die gleichzeitigen, aber viel weniger systematischen von van Tieghem und le Monnier von Bedeutung. Brefeld hatte seine ersten Versuche an die von de Bary angeschlossen, gelangte aber mit der Zeit zu immer vollkommeneren und umfassenderen Methoden, so dass er schliesslich allen Aufgaben gewachsen war und sein System auch mit Erfolg auf Spaltpilze anwenden konnte. Im ersten Hefte seiner „Untersuchungen über Schimmelpilze“, 1872, zeigt sich das System bereits so vervollkommnet, dass er Mucor mucedo von der Spore bis zum Sporangium ziehen und fortdauernd beobachten konnte, ausgehend von einer einzelnen Spore in einem Tropfen frischen Pferdemistdekoktes auf dem Objektträger. Über die weiteren Verbesserungen und den Abschluss der Methoden gibt dann Brefeld im IV. Hefte eine Zusammenstellung. (33)

„Künstliche Nährlösungen geben ein geeignetes Substrat, wenn es diejenigen Substanzen gelöst enthält, die in einem festen Substrat, worauf der Pilz in der Natur vorkommt, sich finden. So gelingt es in vielen Fällen, solche Nährlösungen durch Auskochen des Substrates herzustellen, z. B.

Mist von Kräuter fressenden Tieren; Dekokt von frischem Mist ist für die meisten Pilze geeignet, dann Nährlösungen aus Dekokt von süssen Früchten nach dem Neutralisieren mit Ammoniak, ungegorene Bierwürze, auch Dekokte von Heu, Wurzeln, Holz, Abkochung von Hefe mit Zuckerzusatz, Fleischextraktsolution mit und ohne Zucker.

Neutrale oder schwach saure Lösungen sind am geeignetsten für die meisten Pilze. Um reines Sporenmaterial zu erhalten, muss man mit Wasser verdünnen, bis je ein einziger Pilz zur Aussaat kommt; auch das Nährmaterial ist dafür wichtig nach Reaktion und Substanz; auch das Sauerstoffbedürfnis kann benützt werden. So wurde Alkoholhefe rein gezogen, da ohne Luftzutritt in sauerer Mostflüssigkeit nur sie allein gut gedeiht und alle anderen Pilze überwuchert, Für Spaltpilztrennung gilt ähnliches, abgesehen von der Isolierung durch Verdünnung mit Wasser können hier auch verschiedene Lebensweise und anderweitige physiologische Momente zur Trennung benutzt werden. Bei Spaltpilzen kann ausserdem die ganz verschiedenartige Widerstandsfähigkeit gegen äussere Einflüsse, besonders Hitze, verwandt werden. Es gibt Formen, die Siedehitze leicht ertragen, wenn sie Sporen gebildet haben.

Um einen einzelnen Keim für die Kultur zu isolieren, wird eine kleine Partie des Materials gleichförmig mit Wasser gemischt und so lange verdünnt, bis sich in einer mit einer lanzettförmigen Nadelspitze herausgenommenen Probe nur ein Keim findet. Den Tröpfchen, die man auf die reinen Objektträger übertragen hat, setzt man ein oder zwei Tropfen reiner Nährlösung zu. Wenn die Spore zu klein für diese Prozedur ist, kann man die mit der Keimung um das mehrfache des Volums auftretende Vergrösserung benutzen und verdünnt also nicht mit Wasser, sondern mit Nährlösung und wartet das erste Keimungsstadium ab.

Die Kulturen auf Objektträgern werden unter einer Glocke in dunstgesättigter Luft aufbewahrt und beliebig besehen, eventuell für jede Beobachtung eine geopfert. Für ununterbrochene Kulturen genügen diese nicht, da der Kulturtropfen verdunstet, der Keimling abstirbt und auch bei der Länge der Zeit Invasion fremder Keime der Luft nicht vermeidbar ist. Daher nimmt man entweder feste Nährböden: Nährlösungen mit Zusatz von Caraghen oder Gelatine, so dass sie bei 30—35° noch flüssig, bei 15° fest sind; sie können umgedreht und so gegen Einfallen fremder Keime geschützt werden, oder besondere Objektträger, worin Verdunstung und Invasion unmöglich ist. Am primitivsten im hängenden Tropfen, ein Deckglas auf einem Glasring, der auf dem Objektträger aufgelegt oder angekittet ist, mit seitlich eingeschmolzenen Zu- und Ableitungsröhren für feuchte Luft oder besser eine Kammer, die in der mittleren Verbreitung und Vertiefung Wasser enthält und eingeschlossene Zuleitungsröhren hat. Am besten ist die Kammer von Recklinghausen. Man muss die mit Pilzkeimen beschickte Nährlösung so verdünnt bemessen, dass in dem capillaren Tropfen der Kammer nur eine Spore zurückbleibt. Aber auch sie ist für einzellige Pilze, besonders Spaltpilze, nicht recht geeignet, da sie mit stärksten Linsen nicht fixierbar ist und Ortsveränderungen der Pilze erlaubt. Fixierung der Keime erreicht man nur in dünnen Flüssigkeitsüberzügen in kleinen Kammern ohne capillaren Raum und so flach auf beiden Seiten, dass ein gleichmässiger Überzug entsteht. Man saugt die Kammer voll, lässt ausfliessen und stellt das Mikroskop auf einzelne haftengebliebene Keime ein, die vorher nicht so verdünnt werden brauchen. Diese Kammer kann auch an einem feuchten warmen Ort für Keime, die nur bei gewisser Wärme gedeihen, z. B. viele Basidiomyceten bei 35—40°, längere Zeit gehalten werden ohne alle Störung.“

Die Arbeit von van Tieghem und le Monnier erschien 1873.(34) Auch hier wurde ein Kulturapparat beschrieben, der dauernde mikroskopische Beobachtung gestatten sollte. Auf einem Objektträger war ein Glasring von 4—5 mm Höhe aufgekittet, ein genau darauf passendes rundes Deckglas wurde darauf durch drei kleine Öltropfen gehalten; auf seiner Unterseite war ein kleiner Tropfen Nährflüssigkeit und im Grunde der Kammer etwas Wasser, um stets Feuchtigkeit darin zu haben. Als Nährlösungen dienten Fruchtsäfte, Pferdemist, Bierwürze, Hefenwasser und künstliche Lösungen.

Der erste, dem die Reinkultur der Spaltpilze gelang, war Pasteur. Er befasste sich mit dem Studium der Gärungserreger, und für diese ersann er sich eine Methode, die zu ihrer Reinkultur genügte. Durch die einmal durch sie eingeleitete Gärung erlangen diese Pilze einen so grossen Vorteil gegenüber allen Konkurrenten, dass sie schliesslich bei mehrfacher Übertragung sicher nur mehr allein vorhanden sind.

1857 führte Pasteur die erste Reinkultur aus, die des Milchsäurefermentes.(36) Er zog die lösliche Substanz der Bierhefe durch Kochen mit Wasser aus, setzte das 15—20fache Volumen Wasser, 50 g Zucker und Kreide bis zur Neutralisation hinzu und hatte nun einen geeigneten Nährboden, auf dem der Spaltpilz nach mehrmaliger Übertragung alles überwucherte. Auch der rohe Zwiebelsaft erwies sich als guter Nährboden infolge seines Gehaltes an Öl, das das Wachstum der Hefepilze hinderte. Nach dem Entweichen dieses schwefelhaltigen Öles durch Kochen entwickelte sich dagegen die Bierhefe gut und vergärte zugesetzten oder vorhandenen Zucker.

Die gleiche Methode, durch wiederholte Übertragung in geeignete Medien ein Überwuchern der Gärungserreger zu

veranlassen, führte 1858 zur Isolierung des Weinsäurefermentes.(37) Reines weinsaures Ammoniak wurde in destilliertem Wasser gelöst, 2—3‰ lösliche Eiweissubstanz, wie Pflanzensaft oder Bierhefenabsud, zugefügt und eine Spur von einer bereits gärenden Lösung. Vergärte er das Ammoniumsalz der razemischen Weinsäure, so wurde nur die rechtsdrehende Säure vergärt, die linksdrehende blieb unverändert.

1861 beschreibt Pasteur die Versuche, die ihn zum ersten Male einen Anaerobier kennen lehrten, den Buttersäurebazillus,(40) dessen Gedeihen in Abhängigkeit mit dem Fehlen des Sauerstoffs ihm bald auffiel. In einer Lösung von Zucker, Ammoniumsalzen und Phosphaten konnte er ihn rein kultivieren. Liess er einen Kohlensäurestrom durch eine Kultur durchgehen, so blieb das ohne Einfluss, wenn er aber unter gleichen Bedingungen nur 1—2 Stunden Luft durchtrieb, so starben alle Stäbchen ab. Das brachte ihn zu neuen Ideen und Untersuchungen. Ist Gärung nicht das Leben ohne Sauerstoff der Luft, der Stoffwechsel, der alle seine Produkte durch Abbau komplizierterer Verbindungen in niedere gewinnt? Um diese Theorie zu beweisen, stellte er im Laufe der nächsten Jahre mancherlei Versuche an, meist mit Bierhefe. So brachte er in einen Glasballon (41) von $^1/_4$ l Inhalt 100 ccm Zuckerwasser mit etwas Eiweisssubstanz, zog den Kolbenhals über der Flamme aus und brachte ihn nach dem Erkalten unter Quecksilber. Die Kolbenflüssigkeit wurde zur Entfernung der Luft gekocht und während des Erkaltens trat Quecksilber ein. Dann wurde unter Quecksilber der ausgezogene Teil des Halses abgebrochen und etwas frische Bierhefe hineingebracht. Wenn diese auch nur langsame Vermehrung und geringe Gärung zeigte, so geschah es doch bei völligem Sauerstoffmangel.

1863 fand Pasteur dann einen weiteren Anaerobier,

das Ferment des Kalktartrats.(42) In eine Flasche mit glattem Boden und ausgezogenem Hals, an den ein oben umgebogenes Glasrohr angeschmolzen war, wurde reines Wasser eingefüllt und in dieses Kalktartrat mit einigen Tausendstel Ammonium-, Erd- und Alkaliphosphat gebracht. Nach der Beschickung kochte er die Flasche, während das gebogene Glasrohr in ein Gefäss mit gleichfalls kochendem, destilliertem Wasser tauchte. So wurde alle Luft ausgetrieben, dann eine dichte Öldecke über die Oberfläche des Wassers in dem Gefässe ausgebreitet. Wenn nun schnell in die Flasche mit dem Kalktartrat sehr wenig von einer schon in Gärung befindlichen gleichen Flüssigkeit gesäet wurde, das bei der Einsaat entfernte wenige Wasser durch ausgekochtes, luftfreies ersetzt und nachher das umgebogene Glasrohr in Quecksilber getaucht wurde, so vermehrten sich die Fermenterreger ohne eine Spur von Sauerstoff.

Von den Schülern Pasteurs untersuchte 1864 van Tieghem das Ferment der ammoniakalischen Urinfermentation. Säete er den Micrococcus ureae aus einem gärenden Urin in einen verstopften Kolben mit einer Lösung von 25 g Harnstoff auf 1 l Hefenwasser, und impfte er von Lösung zu Lösung fort, so konnte er eine Reinkultur erhalten, wenn er nur den Luftzutritt beschränkte, da sonst meist andere Keime sich entwickelten.(43)

1875 stellte Pasteur eine vereinfachte Wiederholung seiner Anaerobierkultur der Bierhefe von 1861 an.(44) Er benutzte einen Glasballon mit zwei Tubuli, deren einer, ausgezogen und abgebogen, als Ableitungsrohr diente, während an den anderen ein Gefäss mit einem Hahn angeschmolzen war. In den Ballon wurde gezuckertes Hefenwasser gefüllt und ausgekocht, um alle Luft zu vertreiben, und das Ableitungsrohr dabei in ein Gefäss mit siedender gleicher Flüssigkeit gebracht. Nach dem Erkalten wurde es in Quecksilber

gebracht, in dem angeschmolzenen Gefäss 3—4 ccm Zuckerwasser vergoren, der Hahn geöffnet und einige Tropfen der fermentierenden Flüssigkeit in die Ballonflüssigkeit tropfen gelassen, die dann völlig ohne Sauerstoff vergären konnte. In seinen Studien über das Bier(45) stellte er dann alle Versuche und Beweise für die Gärungstheorie zusammen. Hier findet sich diese zweite und exakte Versuchsanordnung für anaerobische Kulturen der Bierhefe auch auf das „Ferment des Kalktartrates“ und den Buttersäurebazillus angewendet. Zur Kultur des letzteren wurde die Flüssigkeit in einen grossen Kolben mit flachem Boden und zwei Tubulis gebracht, deren einer in ein Gefäss mit gleicher Flüssigkeit tauchte, während an den zweiten ein verschliessbares Gefäss angesetzt war, das mit Kohlensäure, später mit 10 ccm der Kulturflüssigkeit, aber bereits gärend, gefüllt wurde. Den Kolben mit Nährlösung hatte er eine halbe Stunde lang gekocht, den ersten Tubulus nach dem Erkalten aus der Flüssigkeit in Quecksilber gebracht, den zweiten mit der gärenden Lösung gefüllt und etwas davon in den Kolben tropfen lassen, wo dann die Kultur sich bildete. So wurde eine streng anaerobische Kultur durchgeführt. Zugleich hatte Pasteur den Bazillus einer dauernden Beobachtung unterworfen, indem er an den ersten Tubulus mit einem Kautschukschlauche eine auf dem Objekttische eines Mikroskops ruhende Geisslersche Kammer anschloss, deren Inhalt auf der anderen Seite in ein Glas abfliessen konnte. Wurde ein am Tubulus befindlicher Hahn geöffnet, so drückten die Gase des Kolbens Flüssigkeit in die Kammer, die von dort in das Glas abfloss. So sah Pasteur die lebhafte Eigenbewegung und Vermehrung der Bazillen während der Gärung, wenn sich diese ihrem Ende zuneigte, stellte sich Sporenbildung ein, und schliesslich sanken die Bazillen bewegungslos zu Boden. Zum ersten Male waren hier in einer Reinkultur sämtliche Entwicklungs-

stadien eines Spaltpilzes einer fortlaufenden Beobachtung unterzogen worden; was andere trotz Mühe und Genauigkeit mit eigens dazu erdachten Apparaten nicht hatten zustande bringen können, das fand Pasteur eigentlich als Nebenergebnis seiner Arbeiten, denn alle diese waren hauptsächlich als Beweise für seine Gärungstheorie erdacht und ausgeführt worden.

Unter den Gärungserregern beschäftigten ihn auch jene, die im Gegensatz zu den Anaerobiern ein starkes Sauerstoffbedürfnis haben, so dass sie sich nur auf der Oberfläche der Flüssigkeiten in Form eines Häutchens ansiedeln. Danach nannte er sie „mycodermes“, gleichgültig, wie sie sonst aussahen. Denn was er als Mycoderma aceti beschrieb, war ein Bakterium, während Mycoderma vini der heute noch so genannte Sprosspilz war. Diese beiden stellte er in Reinkultur dar, (46) untersuchte ihr Fortkommen auf Wein, Bier, Essigsäure mit und ohne Mineralienzusatz und fand, dass Mycoderma aceti, untergetaucht, sich wohl weiter vermehrt, aber ohne Essigsäurebildung. Mycoderma vini wurde von ihm rein gezogen, indem er es von dem Häutchen mit einer Platinnadel von Wein auf Bierwürze, von da auf gezuckertes Hefenwasser und schliesslich wieder auf Bierwürze aussäete und es so von allen fremden Keimen reinigen konnte, auch von Mycoderma aceti, das auf gezuckerten neutralen Flüssigkeiten nur schwer fortkommt. Pasteur erkannte auch, dass Mycoderma vini, untergetaucht, Alkohol bildet, dass es Alkohol, Hydrocarbonate, Essigsäure und andere organische Säuren oxydiert, den Alkohol in guten Nährlösungen sogleich in Kohlensäure und Wasser spaltet, bei schlechter Ernährung aber, z. B. auf reinem, verdünntem Alkohol, geringere Energie entwickelt und nur bis zur Essigsäurebildung geht, dass dagegen Mycoderma aceti stets nur Essigsäure bildet, wenn genügend Alkohol vorhanden ist, denn mit Erschöpfung desselben oxydiert es die gebildete Essigsäure weiter.

Ausser der Methode, mit Hilfe ihrer Gärtätigkeit den Gärungserregern das Übergewicht über die anderen vorhandenen Keime zu geben und so ihre Reinkultur durch mehrmalige Übertragung zu erzielen, hat Pasteur noch eine zweite gefunden, die er allerdings nur für Schimmelpilze verwandte. Kolben mit für diese geeigneter Nährflüssigkeit gefüllt, wie z. B. mit Hefenwasser, Hefenwasser mit Zucker, Bierwürze etc., wurden zur Siedehitze erwärmt. Während der Dampf aus dem Halse ausströmte, wurde dieser zur Spitze über einer Flamme ausgezogen. Nach dem Erkalten brach Pasteur die Spitze ab, liess durch den verdünnten Raum im Kolben etwas Luft einsaugen und schmolz die Spitze wieder zu. Bequemer und fast ebenso sicher war es, nicht beliebige Luft einzusaugen, sondern mit Hilfe eines Metalldrahtes von einer gewöhnlichen Pilzkultur Sporen in die Luft fallen zu lassen und diese dann einzusaugen. So erhielt Pasteur von Penicillium glaucum, Aspergillus glaucus, Mucor racemosus und Mucor mucedo Reinkulturen und stellte bei ihnen eine, wenn auch geringe Alkoholgärung fest, wenn sie untergetaucht lebten.

In den „Etudes sur la bière“ gibt Pasteur dann noch einen Überblick über die Versuche mit Bierhefe, die er seit seiner Abhandlung 1860 gemacht hat. Damals hatte ihn nur die rein chemische Seite der Gärung interessiert und die Widerlegung der Liebigschen Theorie dafür, weniger die botanische Klassifizierung, die Trennung der einzelnen Arten sowie eine wirkliche Reinkultur. Später hat er die einzelnen Formen näher untersucht, die Isolation der kleinsten Traubenhefe von den anderen Hefen durch Gärung von filtrierter Traubenwürze durchgeführt, da sie leichter durch Filter geht als die anderen Arten. Den Saccharomyces pastorianus, die Hefe der sekundären Gärung jener Weine, die nach der ersten Gärung süss bleiben, hatte er dann studiert und bei ihm

einen Formenwechsel je nach dem Nährboden gesehen. Er fand noch weitere Hefeformen und in 10%igem, etwas angesäuertem Zuckerwasser ein gutes Medium zur Reinigung der Hefe, die er dann auf Bierwürze mit Kaliumbitartrat- und Alkoholzusatz rein züchten konnte.

Die grossen Erfolge Pasteurs mit seiner Methode, durch wiederholte Übertragung in geeignete Nährlösung seine Gärungserreger rein zu züchten, veranlassten einen deutschen Forscher, Edwin Klebs, diese Methode auch für seine Versuche anzuwenden. Da aber Klebs keine Gärungserreger untersuchte, sondern pathogene Mikroorganismen und Kulturbedingungen anwandte, die für diese ungünstiger wie für andere Mikroben lagen, so konnte er nicht zu Resultaten wie Pasteur kommen. Es ist bedauerlich, dass Klebs von falschen Voraussetzungen ausging, die den Erfolg von jahrelangen Bemühungen vereitelten.(47) Klebs erdachte sich eigene Apparate und Nährböden für Dauerbeobachtungen und filtrierte als erster bakterienhaltige Flüssigkeiten durch Tonfilter. Seine unglückliche Reinkulturmethode ging von der Voraussetzung aus, dass er mit Hilfe einer „fraktionierten Kultur", d. h. durch Übertragen einer Spur der keimhaltigen Substanz auf einen Nährboden und einer Spur von diesem nach dem Wachstum des Organismus darauf auf einen zweiten u. s. w., eine Reinkultur des gewünschten Pilzes erhalten müsste, den er dann in einer Glaskammer auf Hausenblasengallerte wachsen lassen und dabei einer Dauerbeobachtung unter dem Mikroskope unterziehen könnte, um so den ganzen Lebenslauf gesehen zu haben. Einmal war nun die Voraussetzung falsch, dass sich der im Ausgangsmaterial in überwiegender Menge befindliche pathogene Mikroorganismus unter den neuen Bedingungen der künstlichen und ganz andersartigen als der für ihn normalen Nährböden auch weiter in der Oberhand halten musste, vielmehr wird diese Rolle wohl

meist von einem harmlosen Saprophyten übernommen worden sein; und dann erhielt Klebs dabei nicht einmal immer wirkliche Reinkulturen. Da er nun alles, was er auf der Gelatine wachsen sah, für Formen des von ihm gesuchten Spaltpilzes ansah, so ergab sich daraus ein recht verwickeltes Lebensbild für diesen. Bei dem ersten Versuche mit dieser Methode, den er mit dem Microsporon septicum anstellte, fand er nach vierfacher fraktionierter Kultur in 2%igem weinsaurem Ammonium bei Beobachtung in der Kammer Stäbchen und amöboide Zellen. Da er bei der Kultur eines anderen, angeblich pathogenen Kokkus, den er für den Diphtherieerreger hielt, Stäbchen wachsen sah und daneben auch Mikrokokkenhaufen, so kam er zu der Meinung, dass Stäbchen und Kokken nur Entwicklungsformen ein und desselben Organismus wären, und kritisierte daher das von Ferdinand Cohn aufgestellte System der Spaltpilze, das hierin einen scharfen Unterschied machte. Klebs kannte nur morphologische Eigenschaften der von ihm beobachteten Lebewesen, wie ja auch die meisten anderen Bakteriologen der damaligen Zeit; da aber die gesehenen Formen gar nicht einem, sondern mehreren Organismen zukamen, so gelangte er zu merkwürdigen Charakteristiken. Unter den von ihm Monadinen benannten Spaltpilzen fand er einen bei verschiedenen Krankheiten, zuerst in der Lungenflüssigkeit eines an Lungenentzündung Verstorbenen, der zu Ketten von Kokken, zu Stäbchen und Haufen auswuchs bei direkter Beobachtung, wie auch nach fraktionierter Kultur; und da er ihn bei allerlei Erkrankungen des Herzens, der Lungen, der Nieren und anderer Organe fand und er bei Impfungen mit dem Bronchialsekret Pneumonie-Kranker solche Krankheiten bei Tieren wieder erzeugen konnte, so hatte er in dieser vielseitigen Monas pulmonalis angeblich einen Erreger von Coryza, Pneumonie, Nephritis, Hepatitis interstitialis, akuter Darmaffektion

und wahrscheinlich auch von Parotitis epidemica entdeckt. In späteren Untersuchungen hat er dann noch die Erreger der Syphilis und Malaria auf Gelatine und Hühnerei angeblich rein kultiviert und dabei wieder Kokken und Stäbchen gesehen. Während er aber mit diesen Kulturen bei Syphilis nur zweifelhafte Impferfolge erzielte, positive nur durch direkte Überimpfung von Schankermaterial auf eine Äffin glaubte er, dass er mit den aus Schlamm und Luft gezogenen Kulturen des „Bacillus Malariae“ sowie mit Schlamm selbst und mit Erdfiltraten echte Malaria übergeimpft habe. Zu gleicher Zeit veröffentlichte ein Schüler Klebs' eine Abhandlung(48) über Impftuberkulose, der mit der nach Klebsscher Methode gefundenen „Monas tuberculosa“ auch positive Impferfolge erzielt haben wollte. Diese beiden Arbeiten und so manche andere der damaligen Zeit zeigen, dass das Tierexperiment keine so einfache und eindeutige Versuchsform ist, wie es die Forscher jener Zeit glaubten. Klebs machte später gegenüber Koch Prioritätsansprüche geltend für die Entdeckung des Tuberkelbazillus. Auf Hühnereiweiss kultivierte er und fand bewegliche Körnchen und daneben nur selten und unter besonders günstigen Umständen äusserst zarte, kurze Stäbchen. Mit der dritten Generation dieser Monas tuberculosa erzielte er zum Teil positive Impferfolge. Ich glaube, dass Koch mit Recht die Ansprüche Klebs ablehnte, auch die späteren Beschreibungen, die Klebs von diesen Kulturen und Impfungen gab,(49) scheinen keine Tuberkelbazillen zur Grundlage gehabt zu haben. Der Apparat zur Dauerbeobachtung, in den Klebs die durch die fraktionierte Kultur isolierten Keime brachte, und den ich bisher noch nicht beschrieben habe, war eine Recklinghausensche Kammer oder eine ähnliche mit parallelen Wänden, gefüllt mit Hausenblasengallerte. Oder er benutzte eine flache Glaskapsel mit einer ca. 1 cm weiten Öffnung an der oberen

Fläche, auf deren gewulsteten und eben abgeschliffenen Rändern ein Deckglas aufgekittet war. Auch ein Apparat aus zwei planparallelen, abgeschliffenen, zusammenschraubbaren Messingplatten schien sich zu bewähren, deren obere in der Mitte eine schwach konische Öffnung trug, die im unteren Teile durch ein aufgekittetes Deckglas geschlossen war. Die untere Messingplatte hatte eine entsprechende runde Öffnung, in der ein Glasstück eingekittet war. Der capillare Raum zwischen den beiden Glasplatten kommunizierte mit einer um die Gläser herumlaufenden Rinne, die auch mit zwei Ansatzröhren verbunden war. In die obere Messingplatte waren Eisenstücke mit Löchern eingelassen, in das in letzteren befindliche Quecksilber tauchten Thermometer zur Temperaturbestimmung der erwärmten Gallerte. In die mit Wasser gefüllte konische Vertiefung der oberen Messingplatte konnte eine Linse des Mikroskops eingesenkt werden.

Derartige Kulturapparate und feuchte Kammern standen schon seit längerer Zeit im Gebrauch. Die erste feuchte Kammer wurde 1863 von v. Recklinghausen ersonnen,(91) um pathologische Präparate, nicht Mikroorganismen, längere Zeit beobachten zu können. Die zweckmässige Verbesserung habe ich schon beschrieben, die ihr Rindfleisch 1871 anfügte, um seine sterilen, aseptisch entnommenen Muskelstücke zu beobachten. Die zweite, spätere Recklinghausensche Kammer, vom Glasbläser Geissler ausgeführt, kam dann in der Bakteriologie zu ausgedehnter Verwendung. Sie hatte aber bereits eine, wenn auch primitive Vorgängerin in einem Apparate, den Duclaux 1863 beschrieb,(92) zur bakteriologischen Beobachtung der Keime der Luft: eine Kammer mit Nährlösung, durch zwei Zwischenwände aus Wollfäden in drei Teile geteilt, nur über dem mittleren ein Deckglas und drinnen die Sporen, die beiden anderen dienen zur Erneuerung der Luft und der Nährlösung im mittleren Teil.

Eine Veränderung der Recklinghausenschen Kammer stellen die Apparate von Klebs, van Tieghem und Brefeld vor, ohne aber eine besondere Verbesserung zu bringen. Eine wesentliche Vereinfachung zeigte erst der hohlgeschliffene Objektträger Kochs, den ich bei dessen Versuchen beschreiben werde, und ein universeller Apparat, sowohl für Aerobier wie Anaerobier benützbar, war die Kammer Prazmowskis, die bei seinen Arbeiten geschildert wird.

Ein Schüler Pasteurs, Boutroux, benutzte die Gärtätigkeit des Milzsäurebazillus 1878 zu dessen Reinkultur.(69) Er entwickelte sich in Zuckerlösung, Hefenwaser, Malz- und Heuinfus, in Lösungen von Inwertzucker und Glukose besser als in Kristallzuckerlösung, am besten in einer Mischung von Hefenwaser und Glukose. Beim Durchleiten von Kohlensäure oder beim Abschmelzen der Röhren und Sauerstoffabschluss fand keine Vermehrung statt. Sporenbildung war nicht festzustellen. Boutroux glaubte seinen Bazillus mit dem von Pasteur Mycoderma vini genannten Bazillus identifizieren zu können und fand, dass er sich auch in Hefenwasser mit Alkohol und mit oder ohne Essigsäurezusatz entwickelte.

Miquel konnte 1879 aus Abfluss- und Niederschlagswasser(70) einen Bazillus isolieren infolge seiner seltsamen Eigenschaften, die ihn von allen anderen Lebewesen unterschieden. Er zerstörte das unlösliche Eiweiss und entzog ihm die Hauptmenge seines Schwefels, den er zu Schwefelwasserstoff verarbeitete. Statt des Eiweisses konnte auch vulkanisierter Kautschuk als Schwefelwasserstoffquelle dienen. Sammelte sich zu viel Schwefelwasserstoff an, so stellte der Bazillus seine Tätigkeit ein, dagegen störte ihn Sauerstoffmangel nicht. Er zeigte Eigenbewegung und wuchs unter günstigen Bedingungen zu langen Fäden aus. In schwefelfreien Nährböden bildete er Kohlensäure und Wasserstoff.

Auch einen bei 70—72° lebenden unbeweglichen Bazillus fand Miquel(71) und sah ihn in neutralisierter Bouillon gut gedeihen, bei 75° aber seine Vermehrung einstellen.

Man hatte zu Anfang der siebziger Jahre gelernt, überall Mikroorganismen zu finden und stand nun der beängstigend grossen Zahl fast hilflos gegenüber. In den faulenden Geweben, dem kranken Blute, den vegetabilischen Infusionen, die besonders untersucht wurden, erschienen bei der Betrachtung, wie in einem Kaleidoskope, die verschiedenartigsten Formen, Kokken, Bazillen, Vibrionen, Spirillen, die Sporen der Schimmelpilze und Sprosspilze und diese selbst, und man wusste nicht, wie sich die einzelnen entwickelt hatten, ob sie miteinander in Verwandtschaft ständen, ob die eine aus einer anderen oder gar alle aus einer Form entständen. Überall waren Bestrebungen vorhanden, die verwirrende Mannigfaltigkeit in ein System zu fassen, obwohl man erst wenige Spaltpilze hatte rein züchten können. Die Ansicht Cohns, dass man sie nach ihren morphologischen Eigenschaften trennen und einem System einfügen könne, fand grosse Gegnerschaft; Hallier, Hoffmann, Bail, Billroth, Naegeli und andere hatten eine mehr oder weniger weitgehende Überführung der einzelnen Formen ineinander bewiesen zu haben geglaubt. So kam es, dass eine Arbeit J. Schroeters(50) zu einer Bedeutung gelangte, die ihr heute nicht mehr zuzuschreiben ist, wo uns die damaligen Zweifel nicht mehr bewegen. Die günstigen Bedingungen, die Pigmentbakterien bieten, indem sie durch ihre Farbenbildung ihr Vorhandensein und durch die leichte Zerstörbarkeit der Farbe Verunreinigungen der Kultur durch andere Lebewesen erkennen lassen, verhalfen Schroeter zu einem Erfolge. Ausserdem benutzte er zur Kultur feste Nährböden,

wie das schon lange vor ihm von anderen Forschern, z. B. Ehrenberg, Fresenius und Erdmann, bei dem am längsten bekannten Pigmentbakterium, Monas prodigiosa, geschehen war. Das, was die Arbeit Schroeters vor der seiner Vorgänger auszeichnet und was ihr auch die Bedeutung für die Streitfrage nach dem System gab, war der Umstand, dass es ihm durch jahrelang fortgesetzte Bemühungen gelang, nicht nur, wie seine Vorgänger, Monas prodigiosa zu züchten und auf andere Nährböden zu übertragen, sondern auch eine ganze Reihe anderer Pigmentbakterien und nachzuweisen, dass ein jedes einer besonderen Farbe entspreche und diese auch auf der Mehrzahl der Nährböden erzeuge, die er verwandte, nämlich rohe und gekochte Kartoffeln, Stärkekleister, Mehlbrei, Weissbrot, rohes und gekochtes Hühnereiweiss, Milch und Fleisch. Von einer Reinkultur im strengen Sinne kenn man aber nicht sprechen, da er meist neben seinen Pigmentbakterien andere Pilze wachsen sah, die ihm oft seine Kulturen zerstörten und denen er recht hilflos gegenüber stand, da seine primitive Methode darin bestand, Kartoffelscheiben der Luftinfektion auszusetzen und die etwaigen gewachsenen Pigmentkulturen auf andere der oben erwähnten Nährböden zu übertragen, wobei natürlich die Verunreinigungen meist mit übertragen wurden. Immerhin wies er nach, dass es besondere Formen gibt, die roten, gelben, blauen, violetten und braunen Farbstoff auch bei Übertragung auf andere Nährböden erzeugen.

Wenn man irgend einen Mikroorganismus in Reinkultur erhalten will, bedarf es dazu einer Methode, denn die naive Ansicht der Forscher der fünfziger und sechziger Jahre, dass man durch Aussäen einer recht kleinen Menge Substanz eine Reinkultur erhalten könne, hatte sich, wie schon berichtet, als irrig erwiesen. Pasteur hatte dann eine einfache Methode ersonnen, die für die Gärungserreger, mit denen er sich be-

schäftigte, vollständig genügte. Diesen Pilzen gibt die einmal durch sie eingeleitete Gärung einen so grossen Vorteil gegenüber allen Konkurrenten, dass sie nach mehrfacher Übertragung alle anderen überwuchern. Die Forscher, die Pigmentbakterien kultivierten und dabei zu Reinkulturen, allerdings fragwürdiger Art, kamen, bedienten sich dabei der festen Nährböden, die die gebildeten Kolonien isoliert erhielten, und der Farbenbildung, die die Reinheit oder wenigstens doch das überwiegende Wachstum der gesuchten Keime verbürgte. Für alle anderen Mikroben waren aber neue Methoden nötig, so lange man noch nicht das Prinzip der Isolation durch feste Nährböden erkannt hatte, sondern diese nur ohne klare Vorstellung ihrer Vorzüge benützte. Von der Mitte der siebziger Jahre an finden sich denn auch eine Anzahl gelungener Arbeiten mit neuen Methoden.

Als erster trat nach dieser Richtung F. Cohn hervor. Er gewann mit Hilfe der Erhitzungsmethode eine Reinkultur des schon lange bekannten Bacillus subtilis.(51) Die Arbeit Roberts habe ich schon angeführt, in der er fand, dass alkalisch gemachter Heuinfus eine viel grössere Schwierigkeit für eine Sterilisation bietet, als alle anderen untersuchten Substanzen, da er Keime enthielt, die fünf Minuten langes Kochen überstanden und die in der Luft, im Wasser und im gährenden Heuinfus vorhanden sind. Roberts blieb bei dieser Entdeckung stehen und untersuchte nicht, ob es eine oder mehrere Arten dieser merkwürdigen Lebewesen waren, die in seinen Infusen keimten. Von dieser Arbeit, sowie auch von eigenen früheren Versuchen, die ihm die ausserordentliche Widerstandsfähigkeit des Bacillus subtilis gegen hohe Temperaturen gezeigt hatten, ging Cohn aus und erhitzte Kolben mit Heuinfus, die er zuerst durch einen Wattebausch, später durch Ausziehen der Öffnung verschloss. Darin wuchs dann der Bacillus subtilis in Reinkultur und Cohn stellte

fest, dass nach der Aussaat der Sporen diese zu Stäbchen heranwuchsen, die sich vermehrten und zu einer Decke auf der Oberfläche der Flüssigkeit sich sammelten, bis bei Erschöpfung des Nährbodens auf der Unterseite dieser dick und faltig gewordenen Decke die Sporenbildung einsetzte. In einer feuchten Kammer sah er den Keimungsprozess der Sporen vor sich gehen. Bei 47—50° beobachtete er eine lebhafte Vermehrung der Stäbchen, aber nicht mehr bei 50—55°, sondern Absterben nach einiger Zeit, während die Sporen diese Temperatur tagelang aushielten und zur Sterilisation von Heuinfus bei 60° und darüber gewöhnlich 24 Stunden genügten, obwohl einzelne Sporen sich fanden, die ein Erhitzen auf 70—80° 3—4 Tage aushielten, ohne ihre Keimkraft zu verlieren.

Die einfache Methode Cohns wurde in der Folgezeit mehrfach zur Reinkultur benützt, besonders war es der Bacillus subtilis oder mit ihm verwandte Arten, die man damit isolierte.

Zunächst möchte ich noch die Arbeit Brefelds erwähnen, der kurz nach Cohn den Bazillus subtilis einer eingehenden Beobachtung und Kultur unterwarf und sich dabei seiner eigenen Methoden bediente; wie er zu diesen gekommen war, habe ich schon eingehend geschildert. Er hatte sie zur Kultur der Spross- und Fadenpilze ersonnen und gebraucht. Dass sie aber auch zur Reinkultur eines Spaltpilzes geeignet wären, bewies er, indem er mit ihnen 1877 den Bacillus subtilis rein zog.(58) Die in einem dünnen Flüssigkeitsüberzug in den schon beschriebenen Kammern fixierten Bazillen gestatteten eine lückenlose Beobachtung ihres Entwicklungsganges. So stellte Brefeld, wie dies schon Cohn getan hatte, den Formenkreislauf von der Spore bis zur neuen Sporenbildung fest. Er beobachtete, wie die Stäbchen zu beliebiger Zeit in einen Schwärmerzustand übergingen, eine

Geissel vorn und hinten trugen und dabei Wachstum und Vermehrung ungestört fortsetzten. Bei Erschöpfung des Nährbodens gingen sie zur Sporenbildung, die meist in der Mitte des Stäbchens unter Anschwellung an dieser Stelle stattfand, aber auch bisweilen am Ende. Die Sporen waren sofort keimfähig; eine seitliche Ausbuchtung bildete sich beim Keimen, an deren Spitze sich der Sporeninhalt sammelte, die Sporenmembran bekam eine Öffnung und der Keimling wuchs heraus zu einem Stäbchen, das noch lange, oft bis ins Schwärmerstadium hinein die Membran am hinteren Ende trug. Bei 24° fand alle halbe Stunde, bei 20° alle drei Viertelstunden, bei 15° alle 1½, bei 10° alle 4—5 Stunden eine Stäbchenteilung statt, unter 5° nur noch eine sehr langsame Vegetation, nie Sporenbildung, die bei 24° in 12, bei 18° in 24, bei 15° in 48 Stunden, bei 10° in mehreren Tagen eintrat. Nach viertelstündigem Kochen keimten noch alle Sporen aus, nach halbstündigem noch der grösste Teil, nach einstündigem weniger, nach dreistündigem keine mehr. Sporen, die mit Nährlösung in dicken Röhren eingeschlossen waren und im Ölbad erhitzt wurden, waren bei 105° nach einer Viertelstunde tot, bei 107° nach zehn Minuten, bei 110° nach fünf Minuten. Sublimat- und Carbolsäurelösung blieb auch konzentriert auf die Sporen ohne Einfluss, aber nicht Säuren und sauere Agentien; bei ihrer Anwesenheit tötete die Siedehitze sie schneller. Trocken liessen sich die Sporen drei Jahre aufheben ohne Verlust der Keimkraft. Auch andere, dem Bacillus subtilis sehr ähnliche Formen beobachtete Brefeld. Eine bildete unter keulenförmiger Verdickung runde Sporen stets an einem Stäbchenende, war dünner und länger als Bacillus subtilis und ihre Sporen keimten nach dem Kochen nicht mehr. Eine andere hatte freie Sporenbildung an einem Stäbchenende. Die Sporen waren länglich, wie bei Bacillus subtilis, aber grösser, die Stäbchen länger

und dicker. Zwei andere Formen zeigten ebenfalls Sporenbildung. Die Sporen waren länglich und viel grösser als bei Bacillus subtilis, die kurzen, dicken Stäbchen blieben zu Fäden verbunden und waren bei einer Form cylindrisch, bei der anderen spindelig, an der einen Seite weiter als an der anderen bei eintretender Sporenbildung. Auch nicht sporenbildende, sehr grosse Arten fand Brefeld, die in der Kammer zu Kolonien von Stäbchen und Scheinfäden wie ein Nadelkopf wuchsen und durch Schleim zusammengehalten wurden.

Auch Prazmowski kultivierte 1877 den Bacillus subtilis rein (59) und bediente sich dazu der Cohnschen Erhitzungsmethode. Er studierte die Entwicklungsgeschichte des Bazillus in der feuchten Kammer. Zu dieser diente ein Objektträger, $2^1/_2$—3 mm dick, auf der oberen, mattgeschliffenen Seite mit einer ringförmigen Vertiefung von $1^1/_2$ mm Tiefe versehen. Die von diesem Ringe eingeschlossene kreisförmige Fläche war sehr sorgfältig glattgeschliffen und das Niveau etwas tiefer als das ausserhalb des Ringes, aber nur so weit, dass eine nach Auflegen des Deckglases zwischen diesem und der Fläche eingeschlossene Flüssigkeitsschicht in ihrer ganzen Höhe noch den stärksten Vergrösserungen zugänglich war. Seitlich an der ringförmigen Vertiefung war eine kleine Rinne angebracht. In einem Reagensglase wurde 1 ccm Dextrinlösung sterilisiert und mit so viel von einer stark sporenhaltigen Kultur versetzt, dass etwa 5—10 Sporen auf ein Gesichtsfeld kamen. Dann wurde sie fünf Minuten gekocht, ein Tropfen noch heiss auf die kreisförmige Fläche des Objektträgers gebracht und das aufgelegte Deckglas an den Rändern mit einem Wachsüberzug bis auf die seitliche Rinne verkittet. Das Präparat wurde auf dem Schulzeschen Objekttisch bei 30—35° C. gehalten. Prazmowski konnte den schon von Cohn und Brefeld beschriebenen Formenkreislauf beobachten. Bei Sauerstoffmangel wanderten die Stäbchen

zu der offenen Rinne und starben, wenn sie mit Wachs verschlossen wurde. Auch die Beobachtungen Cohns in grösseren Kulturen, die Hautbildung, die Sporenbildung, wurden von Prazmowski festgestellt. Dann machte er Versuche über die Gärtätigkeit. Dazu wurde ein Glascylinder bis über die Hälfte mit Dextrinlösung, Kartoffelstücken oder Lupinensamen mit Wasser gefüllt, 20—30 Minuten im Wasserbade zur Sterilisation und Luftvertreibung gekocht, mit Sporen nach der Abkühlung infiziert, mit einem Baumwollpfropf geschlossen und im oberen Teil über der Flamme in eine feine Spitze ausgezogen. Diese wurde abgebrochen, die Flüssigkeit noch einmal zehn Minuten gekocht und dann sogleich zugeschmolzen, während andere Kontrollcylinder nach dem zweiten Kochen erst zugeschmolzen wurden, wenn sich die im oberen Teile des Cylinders angesammelten Dämpfe niedergeschlagen hatten und so etwas Luft eingeschlossen wurde. Es trat niemals Gärung ein und auch kein Wachstum in den luftleeren Cylindern, geringes in den mit Lufteinschluss versehenen. Prazmowski kultivierte in dem Bacillus ulna einen nahen Verwandten des Bacillus subtilis rein. Er fand ihn unter der Schale von Hühnereien und zog ihn aus den Aufgüssen von gekochtem Eiweiss. Er konnte bei ihm die Bildung der Sporen, aber nicht deren Keimung sehen. Der Buttersäurebazillus wurde in der Kammer unter Sauerstoffabschluss kultiviert, das Auswachsen der Stäbchen, die Bildung von Spindel-, Ellipsoid- und Kaulquappenformen und die Sporenbildung beobachtet. Da die letztere infolge der anhaftenden Buttersäure in der feuchten Kammer zuerst nicht gelingen wollte, wurden frische Kulturen in zugeschmolzenen Cylindern gehalten bis zur Anschwellung der Stäbchen, dann, am dritten Tage, die Cylinder geöffnet, mit kohlensaurem Kalk beschickt, einige Stunden stehen gelassen, der Inhalt wurde zum Teil auf gereinigte Uhrgläser gegossen und be-

deckt im Wärmekasten gehalten. So trat die Bildung der Sporen ein, die mit Erfolg zur Keimung in die feuchte Kammer gebracht wurden. Bei Luftzutritt liess sich der Buttersäurebazillus nie kultivieren. Die Sporen hielten fünf Minuten Siedehitze aus, fünfzehn Minuten aber nie. Clostridium Polymyxa, ein naher Verwandter des vorigen, zeigte gleiche Form, Grösse, Entwicklung und Sporenkeimung, bildete aber oft schlauchartig erweiterte oder gewellte Fäden ohne Gliederung und einmal Ketten von ovalen Zellen. Zur Entwicklung und Sporenbildung bedurfte er des Sauerstoffs, bildete in grösseren Kulturen eine Schleimdecke und spärliche Gasblasen am Boden des Cylinders, die Sporen nur auf der Oberfläche der Flüssigkeit. Bei Luftabschluss fand nur geringe Vermehrung, ohne Sauerstoff gar keine statt. In zugeschmolzenen Cylindern mit Lufteinschluss dauerte die Gärung 2—3 Tage und konnte durch Öffnen der Cylinder wieder neu belebt werden. Nie trat dabei Sporenbildung auf.

Fitz isolierte 1878 aus Kuhexcrementen und Heu zwei Bazillen, die er auf ihr Gärvermögen gegenüber Glyzerin untersuchte.(60) Der eine, dünn und schmal, den er mit dem Bacillus subtilis identifizierte, bildete reinen Äthylalkohol, der andere, dickere Butylalkohol. Da die Sporen des letzteren die Siedehitze nicht so gut ertrugen, so erhielt Fitz nur immer Bacillus subtilis-Kulturen aus den verschiedenen Pflanzenwaschwassern, die er in Kolben mit Zusatz einer angemessenen Menge Glyzerin, Salzen und Calciumcarbonat, bedeckt mit einer Filtrierpapierkappe, fünf Minuten kochte und bei 40° C. im Thermostaten liess. Unterliess er aber das Kochen, so entwickelte sich der Butylalkoholbazillus fast rein und war durch mehrfache Übertragung ganz rein zu erhalten. Den Buttersäurebazillus gewann Fitz aus Kuhexcrementen, seine Gärprodukte waren Normalbuttersäure und Spuren von Capron-, Essig- und Bernsteinsäure. Ein dem

Bacillus subtilis morphologisch gleicher, aber Glyzerin nicht vergärender Spaltpilz wurde dann noch aus Heuwaschwasser gezogen und bei ihm die Bildung von Sporen und voluminösen Zoogloeamassen beobachtet. Auch ein keulenförmiger Bazillus mit Gärvermögen zeigte sich einmal.

1879 isolierte Miquel den Bacillus ureae, indem er Abflusswasser auf 80—90° während zwei Stunden erhitzte.(70) Unter zehn Malen konnte er damit neunmal den Urin bei der Aussaat in Abwesenheit des Micrococcus ureae fermentieren lassen. In eine reine Harnstofflösung, nahrhaft gemacht durch Zusatz von wenig Gelatine, säete er mit einer Platinöse aus dem fermentierenden Urin. Der Bazillus erwies sich als sporenbildender Anaerobier.

van Tieghem isolierte 1879 den Bacillus amylobacter, indem er seine Sporen in kochende Nährlösung einsäete.(72) Er fand, dass dieser Bazillus die Cellulosemembranen embryonaler Pflanzenzellen unter Gasentwicklung mittels eines Fermentes auflöste, aber auch in künstlichen Nährlösungen zu kultivieren war aus löslicher Stärke mit Zusatz von Nitraten und Mineralsalzen oder aus Dextrin-, Glukose- oder Kandiszucker. Er verwandelte alle diese Stoffe erst in Glukose, die er dann unter Gasbildung weiter zerlegte. In derartigen Lösungen griff er die Cellulose der Pflanzenzellen nicht an, so lange ihm noch genügend Zucker zur Verfügung stand. Die gebildete Säure verhinderte, im Übermass entwickelt, sein Wachstum. Der Bazillus war Anaerobier. Während der Wachstums- und Teilungszeit schwärmte er umher, drang dann durch die Cellulosehülle in das Innere der Pflanzenzelle, vermehrte und teilte sich noch einige Zeit und speicherte dann Stärke in seinem Leibe auf. Die embryonalen Zellen aller Pflanzen griff er an, bei den älteren machte er grosse Unterschiede je nach der Art der Cellulose.

Die Erhitzungsmethode hatte zur Reinkultivierung einer

Anzahl von Spaltpilzen geholfen, sie war aber doch nur eine beschränkt benützbare Methode, da ihre Anwendung nur für Bazillen geeignet war, die durch ihre Sporenbildung die Siedehitze ertragen konnten. Eine Methode allgemeinerer Art wurde nun gleichzeitig von mehreren Forschern selbständig ausgedacht. Lister hatte sich schon längere Zeit mit der Mikroorganismen-Flora der Milch beschäftigt, aber seine Resultate, die er zuerst 1873 bekannt gab, führten ihn infolge von Fehlern bei der Aussaat zu irrigen Ansichten.(61) 1878 veröffentlichte er nun eine Arbeit, in der er die Reinkultur des Milchsäurebazillus mit Hilfe der Verdünnungsmethode ausgeführt hatte.(62) Zum Sterilisieren seiner Apparate benützte er einen eisernen Schrank, dessen Türritze mit Watte ausgestopft war und dessen Tür mit Schrauben fest angepresst wurde. Zwischen dem Schrankboden und dem Bunsenbrenner waren drei Eisenbleche eingeschaltet, um die Wärme gleichmässig zu verteilen. Der Schrank befand sich in einer Eisenblechhülle, die fast den Boden berührte, um die Wärmeausstrahlung zu verhindern und die erhitzte Luft längs der Aussenseite des Kastens nach oben zu führen, wo sie durch einen Kamin austrat. Mit Baumwolle dicht eingesetzte Thermometer befanden sich an der Schrankdecke. Die Kulturapparate wurden im Schrank zwei Stunden auf 300° F. erhitzt. Zum Aufbewahren der Flüssigkeiten dienten zweihalsige Kolben; der eine Hals ging vertikal nach oben und war mit reiner Watte verschlossen, der andere ging seitlich ab und hatte ein abgebogenes Ende, das in einer engen Spitze auslief, so dass nach dem Ausgiessen von Flüssigkeit ein Tropfen in dem verengten Teil zurückblieb, der das Eindringen von Luft verhinderte und mit einem karbolisierten Lappen entfernt wurde, worauf die Öffnung mit einem reinen Wattepfropf verschlossen wurde. Zur Kultur dienten Liqueurgläser, die mit einem Uhrglase bedeckt waren und auf einer

Glasplatte unter einer Glasglocke standen. Beim Einfüllen wurde der Wattepfropf von dem seitlichen Kolbenhals entfernt, dessen Ende durch den durchbohrten Mittelpunkt eines halben Gummiballes geführt, der in starker Karbolsäure gelegen hatte, die Glasglocke gelüftet, das Uhrglas durch die Gummikappe ersetzt, eingefüllt und dann wieder Uhrglas, Glasglocke und Baumwollpfropf aufgesetzt. Eine Spritze mit feinem Getriebe gestattete, die Grösse eines Tropfens auszurechnen, der gerade noch die Fläche eines Deckglases bedeckte, wenn er unter dieses auf einen Objektträger gebracht wurde. Aus der Grösse der Deckglasfläche und der eines Gesichtsfeldes, sowie aus der Zahl der Bakterien in letzterem liess sich eine Proportion ansetzen, die für die vierte, unbekannte Grösse, die Keimzahl im Tropfen sauerer Milch, eine Million ergab. Lister stellte nun mit sterilem Wasser eine solche Verdünnung her, dass er in fünf sterilen Milchproben nur einen Keim einsäete mit einem Tropfen nach seiner Berechnung. Eine von diesen Proben zeigte Entwicklung von Lebewesen, eine Reinkultur vom Milchsäurebazillus. Von sechzehn weiteren Proben empfingen nach der Berechnung zehn je einen Keim, davon zeigten fünf eine Entwicklung, fünf je zwei Keime und eine vier Keime, alle zeigten Entwicklung und stets Reinkulturen von Bacterium lactis. Er übertrug es in Urin und von da aus wieder in Milch, die stets gesäuert wurde. In Pasteurscher Flüssigkeit entwickelte sich das Bakterium nur langsam und wurde bei längerer Kultur in seinen Formen immer kleiner, ebenso beim Wachstum in 1200fach verdünnter Milch, und auch im Urin nahm die Grösse bald merklich ab.

Zu einer ähnlichen Methode, wie Lister, kam Hans Buchner bei der Reinkultur der Milzbrandbazillen.(63) Er fand, dass sie am zahlreichsten in der Milzpulpa wären und überwiegend gegenüber anderen Spaltpilzen, die darin noch

etwa vorhanden sein konnten. Er verrieb die Milzpulpa und verdünnte sie mit sterilem Wasser, so dass auf 10 cmm je ein Pilz kam, und bei der Aussaat derartiger Mengen in 0,5%igen Liebigschen Fleischextrakt erhielt er Reinkulturen des Milzbrandbazillus. Diese Kulturen, sowie mit Hilfe von gekochten Heuaufgüssen gewonnene Kulturen von Bacillus subtilis sollten dazu dienen, durch fortlaufende Züchtung die Umwandlung dieser beiden Bakterienarten ineinander zu beweisen und Buchner glaubte diese Umwandlung auch erreicht zu haben, ein Irrtum, der, wie Koch später zeigte, durch Fehler bei der Anordnung dieser Versuche entstand. Dagegen gelang es ihm, bei fortgesetzter Kultur in Fleischextraktlösung mit oder ohne Pepton- oder Zuckerzusatz bei 35—37° abgeschwächte Milzbrandbazillen zu erziehen, die sich mit der Dauer der Kultur immer weniger infektiös zeigten, wenn sie auf Tiere verimpft wurden, deren Nachkommen aber, aus den Organen der geimpften Tiere genommen, zeigten bei weiteren Übertragungen, dass sie ihre volle Virulenz durch die einmalige Tierpassage wieder erlangt hatten. Als Kulturapparat diente ein grosses Gefäss, das Reservenährlösung enthielt, und ein kleines, durch einen seitlichen Tubus mit ihm verbundenes Züchtungsgefäss, in welches aus dem Reserveglas durch einfaches Neigen des letzteren Nährlösung zufliessen konnte. Die äusseren Öffnungen beider Gefässe wurden pilzdicht verschlossen, das ganze im Dampfkessel sterilisiert und das Züchtungsgefäss mit Milzbrandbazillen infiziert. Nach Ablauf der Vegetation wurde die Flüssigkeit durch eine verschliessbare enge Öffnung am Boden des Gefässes abgelassen, die Reste dienten zur weiteren Infektion der aus dem Reserveglas hinzugegebenen Nährlösung.

Auch Hausen erhebt Anspruch, zu gleicher Zeit wie Buchner zur Verdünnungsmethode gekommen zu sein.(64) Er gewann mit ihr Reinkulturen von Hefe. In einem zwei-

halsigen Kolben wurde Wasser sterilisiert und etwas Hefe dazu gebracht, die durch vorbereitende Kulturen in die Oberhand gekommen war. Der Kolben wurde an einen zweiten, mit sterilisiertem Wasser gefüllten Kolben mittels eines Messapparates angeschlossen, einer graduierten Röhre zwischen zwei Guttaperchaschlauchstücken, beiderseits abklemmbar. Der zweite Kolben erhielt Flüssigkeit aus dem ersten und den Messapparat und ebenso nach gehörigem Umschütteln ein dritter u. s. f., bis schliesslich aus dem letzten Kolben mit einer Messröhre von 1 ccm in Kolben mit steriler Würze mit je 1 ccm ein Keim gebracht wurde. Dasselbe erreichte Hausen, wenn er die Keime in einer Zählkammer zählte und mit sterilem Wasser verdünnte, bis er mit jedem Tropfen einen Keim verimpfte.

Naegeli hat nachträglich(65) behauptet, bereits 1870 als erster die Verdünnungsmethode für den Micrococcus ureae zur Reinkultur aus faulem Harn benutzt zu haben, indem er es durch millionenfache Verdünnung erreichte, dass in zehn Gläsern, die mit je einem Tropfen beschickt wurden, fünfmal Micrococcus, einmal Bacterium ureae und viermal nichts wuchs. Es stehen aber mit dieser Behauptung Angaben im Widerspruch, die er 1877 machte,(66) wo er sagte, dass die Reinkultur der Gärungs- und Schimmelpilze in einzelnen Fällen zu erreichen wäre, aber „Spaltpilze gestatten mit Sicherheit keine Reinkultur, teils wegen ihrer ausserordentlichen Kleinheit, teils wegen ihrer allgemeinen Verbreitung in Wasser und in der Luft. . . .“ In einer Zusammenstellung seiner Reinkulturmethoden(67) findet sich die Verdünnungsmethode nicht erwähnt. Er hat allerdings verschieden starke Verdünnungen von Spaltpilzen ausgeführt,(66) aber nur, um die Vermehrungsfähigkeit zu berechnen; dabei hat er die durchschnittliche Lebensdauer einer Generation zu $3^{6}/_{10}$ Stunden gefunden, Einzelaussaaten aber nicht gemacht.

Die Verdünnungsmethode ist, so universal sie auch scheinbar erscheint, doch auch nur von beschränkter Anwendbarkeit. Wenn man nicht wie Hansen die gesuchten Pilze durch vorbereitende Kulturen in die Überhand bringen kann, eine Prozedur, die bei Spaltpilzen selten möglich ist, so ist man auf die wenigen Fälle beschränkt, wo dies bereits von der Natur ohne künstliche Nachhilfe geschehen ist. Auch dann kann durch Zufall einmal einer der in der Minderheit befindlichen Pilze zur Aussaat kommen.

Eine weitere Methode, den Tierkörper als Mittel zur Reinkultur zu benützen, gab Koch 1878.(68) Er züchtete so die Erreger einer Anzahl von Wundinfektionskrankheiten rein und bewies, dass es unter ihnen eine ganze Reihe von spezifisch verschiedenen Spaltpilzen gäbe. Durch Injektion von putrider Flüssigkeit verimpfte er auf Mäuse einen Bazillus, der eine Septikämie dieser Tiere zur Folge hatte, für Kaninchen und Feldmäuse dagegen nicht pathogen war. Septikämisches Blut im hängenden Tropfen eines hohlgeschliffenen Objektträgers im Brutschrank gehalten, zeigte das Auswachsen der Bazillen zu Haufen und zuweilen auch Sporenbildung. Ein Kettenkokkus, der bei Einspritzungen von faulendem Blute einige Male auf Mäuse übertragen wurde und eine progressive Gewebsnekrose veranlasste, war auf diese Weise nicht rein zu züchten, da er stets mit dem Septikämiebazillus vergesellschaftet war. Koch benützte den Körper der Feldmaus, um ihn auf diesem Nährboden rein zu züchten, denn er hatte gefunden, dass die Feldmaus immun gegen den Septikämiebazillus war, ihn nicht wachsen liess. Durch subkutane Injektion von Faulflüssigkeit kam Koch zu einem Erreger progressiver Abszesse beim Kaninchen und züchtete ihn auf Kaninchen fort, ebenso einen Mikrokokkus, der sich als Erreger einer Pyämie erwies und aus der Macerationsflüssigkeit eines Mausefells gewonnen war. Er liess

sich mit dem Blute auf andere Kaninchen übertragen, ohne dass es dabei zu einer merklichen Virulenzsteigerung kam. Auch bei einem anderen Mikrokokkus, den Koch aus faulendem Fleischinfus durch Einspritzen in die Blutbahn bei Kaninchen gewann und als Erreger einer Septikämie erkannte, liess sich keine Virulenzsteigerung nachweisen bei fortgesetzter Übertragung auf Kaninchen. Ein Bazillus, der einen erysipelatösen Prozess bei diesen Tieren verursachte und mit einer Aufweichung von Mäusekot übergeimpft wurde, liess sich mit dem Blut nicht weiter übertragen.

Die Versuche, die darauf abzielten, die pathogenen Keime aus dem Körper heraus auf einen Nährboden zu übertragen und so rein zu züchten, reichen weit zurück. Hier könnte man alle misslungenen Arbeiten anführen, die seit den primitiven Ansätzen von Hoffmann und Hallier bis zu Klebs gemacht wurden. Die erste wirkliche Reinkultur in dieser Hinsicht brachte Kochs Arbeit über den Milzbrand, mit dessen Erforschung sich seit langer Zeit viele abgegeben hatten, ohne doch die Reinkultur seines Erregers ausführen zu können und ohne die Rätsel klären zu können, die ihnen seit seiner Entdeckung infolge der Unkenntnis seiner Sporenform entgegentraten. Die erste Arbeit, die sich mit der Bedeutung der neuentdeckten Lebewesen beschäftigte, war von Brauell;(38) aber sie bewegte sich in den alten Bahnen wie bisher, es wurde nur immer Blut von Milzbrandkranken verimpft, keine Reinkultur versucht, keine längere Beobachtung der Bazillen unternommen, ihre Lebensbedingungen nicht studiert, und so war der Erfolg trotz der Genauigkeit und mancher guten und richtigen Schlüsse gering, und Brauell erklärte als Endergebnis: „Die Impfung mit Milzbrandblut vom Pferde hat tödlichen Milzbrand zur Folge, obgleich das Blut keine stäbchenförmigen Körper enthält und sind daher die letzteren weder der Ansteckungsstoff selbst noch der notwendige Träger desselben.“

Delafond wurde durch Brauells Arbeit zu Untersuchungen veranlasst, er kam aber in der Erkenntnis des Wesens dieser Krankheit viel weiter wie sein Vorgänger.(39) Einmal fand er bei seinen zahlreichen Impfungen stets Stäbchen, während er sie bei den durch Impfung mit putriden Flüssigkeiten erzeugten Krankheiten nie im Blut entdecken konnte, und dann zeigte er, dass der von Brauell und Pollender beobachtete Übergang der unbeweglichen Stäbchen in bewegliche nach dem Tode des Tieres auf einem Irrtum beruhte, dass sie das Auftreten der Fäulnisbakterien dafür gehalten hatten. Delafond konnte das Auswachsen der Monaden und der übrigen Fäulniserreger zu beweglichen Stäbchen im faulenden Blut von an Milzbrand Verstorbenen und von gesunden Tieren erkennen und erzeugte durch ihre Verimpfung wohl eine für Kaninchen tödliche Krankheit, aber keinen Milzbrand, keine Milzbrandstäbchen. Er hielt diese letzteren für eine Leptothrix-Art wegen ihrer Unbeweglichkeit, die sie im Gegensatz zu allen anderen von ihm beobachteten Mikroben hatten, und wollte nun ihr weiteres Wachstum und ihre Sporenbildung feststellen. Er sah sie, wenn er das Blut in offenen Gefässen aufbewahrte, nach vier Tagen zu dreifacher, nach 8—10 Tagen zu vier- bis fünffacher Länge auswachsen und beobachtete auch das Auftreten von Abschnürungen, aber auch bei längerer Aufbewahrung niemals Sporenbildung. Als günstigste Temperaturen für das Wachstum fand er 10—20°, während bei —4° bis +6° und bei 25—26° keine Verlängerung der Bazillen eintrat.

Am eingehendsten beschäftigte sich Davaine mit dem Studium des Milzbrandes.(90) Lang fortgesetzte Impfungen von Tier zu Tier ergaben immer wieder die typischen Krankheitserscheinungen, die Stäbchen im Blut und in den Karbunkeln und ihr Verschwinden mit der Fäulnis. Auch der

Unterschied zwischen Septikämie und Milzbrand wurde immer wieder von Davaine betont gegenüber den Versuchen, ihn zu verwischen. Er zeigte die Verschiedenheit im Krankheitsbild, bei der Sektion und bei der bakteriologischen Blutuntersuchung, aber so sehr er sich auch selber der Richtigkeit seiner Anschauung bewusst war, konnte er doch seine Gegner nicht überzeugen.

Den ganzen Formenkreislauf des Milzbrandbazillus, sein Zusammenhang mit dem Milzbrand, seine Lebensbedingungen und seine Reinkultur wurden zuerst von Koch dargestellt. Auf einen Objektträger(52) brachte er einen Tropfen möglichst frischen Rinderblutserums oder Humor aqueus und in diesen ein kleines Stück frische bazillenhaltige Milzsubstanz, bedeckte den Tropfen mit einem Deckglase und hielt ihn im feuchten Raume im Brutkasten bei 35—37° 15—20 Stunden. Dann waren die Bazillen auf das 3—8fache ausgewachsen, zu Fäden und um so länger, je näher dem Deckglasrande. Auch Sporen waren zu finden und alle Übergänge vom Stäbchen zu langen, sporenhaltigen Fäden und freien Sporen. Da diese Präparate oft von fremden Keimen befallen wurden, verbesserte Koch seine Methode: Ein heizbarer Schulzescher Objekttisch wurde mit einer Petroleumlampe erwärmt, der feuchte Raum durch einen durch das Deckglas geschlossenen, hohlgeschliffenen Objektträger ersetzt und mit Hilfe von Rindertalg mit 40° Schmelzpunkt die Wärmemenge gefunden, die nötig war, um dem Präparat die genügende Temperatur zu erhalten. Auf die Deckglasunterfläche kam ein frischer Tropfen der Kulturflüssigkeit und in den Tropfenrand etwas bazillenhaltige Milzsubstanz. So beschickt, wurde das Deckglas auf den mit Öl bestrichenen Objektträger gelegt. Obwohl auch von diesen Präparaten nicht alle frei von fremden Keimen blieben, konnte Koch doch in ihnen die Entwicklung gut beobachten. Zuerst wollten die Sporen nur auskeimen,

wenn er sie am Deckglase antrocknen liess und nach Stunden oder Tagen wieder mit einem Tropfen Kulturflüssigkeit anfeuchtete. Später konnte er im gleichen Tropfen aus Bazillen Sporen und wieder Bazillen ziehen, wenn er nur wenige Bazillen hineinbrachte und das Nährmaterial bis zur Sporenbildung noch nicht erschöpft war. Bazillenhaltige Substanz verimpft, verursachte stets Milzbrand; wenn er sie trocknen liess, blieb sie ansteckungsfähig je nach der Schichtdicke 12 Stunden bis 4—5 Wochen, aber nie länger. Die Bazillen wuchsen am besten bei 35° mit Sporenbildung nach 20 Stunden, unter 18° wuchsen sie nur selten, bei 12° nie, über 40° nur kümmerlich, bei 45° stellten sie ihre Lebenstätigkeit ein. War Sauerstoff vorhanden und die Temperatur geeignet, so gediehen die Bazillen auch in faulenden Flüssigkeiten. Liess Koch Milz- oder Blutsubstanz langsam trocknen und es so zur Sporenbildung kommen, so war sie noch nach Jahren fähig, Milzbrand zu erzeugen. Hunde, Hühner, Frösche und Sperlinge zeigten sich immun, vom Darmkanal aus durch Fütterungsversuche waren auch Kaninchen und Mäuse nicht infizierbar.

1876 hat auch Frisch die Bildung von Milzbrandsporen beobachtet.(53) Er benützte die Kaninchen-Cornea, um in ihren Spalträumen eine ziemlich ausschliessliche Entwicklung von Milzbrandbazillen beim Einimpfen zu beobachten. Er stellte die Bildung von Sporen fest und die Bildung von neuen Fäden, wenn er die nur sporenhaltige, verriebene Milzpulpa überimpfte. Da er aber Bewegungen der Milzbrandbazillen gesehen haben will und Kügelchenbildung, die aus Schläuchen entleert wurden, so hat er sicher keine Reinkulturen gehabt. Übrigens ist die Methode, die Cornea zu Impfungen zu benutzen, schon vor ihm angewandt worden. Nassiloff hat so diphtherische Massen 1870 übergeimpft,(54) Grohé maligne Schimmelpilze,(55) und Eberth(56) kam be-

reits so 1872 zu ziemlich reinen Milzbrandkulturen, die er nur aus Mangel an Material nicht weiter fortführen konnte.

Zu einer eigenen Methode, mit der es ihm gleichfalls gelang, Reinkulturen von Bakterien aus dem Tierkörper heraus zu gewinnen, kam 1876 C. J. Salamonsen.(57) Liess er defibriniertes Ochsen- oder Lammsblut in einem cylindrischen Gefässe bei 5—10° unberührt stehen, so entstanden nach wenigen Tagen kleine schwarze Flecke, die wuchsen und schliesslich zusammenflossen und in verschiedenen Schichten an Form und Farbe infolge des wechselnden Sauerstoffgehaltes verschieden waren. Machte er den gleichen Versuch mit Haarröhrchen, die er nach einigen Tagen nahe den schwarzgefärbten Partien der Fäulnisflecke abbrach und deren Inhalt er dann auf Objektträger blies und untersuchte, so fand er in jedem Fleck eine bestimmte Bakterienform; bewegliche kamen schneller wachsenden Flecken zu, und diese waren auch sonst zu unterscheiden nach der Zeit ihres Auftretens, ihrer verschiedenen Zahl in den einzelnen Blutproben und der Form und Farbe. Mit derartigen Flecken stellte er dann Kulturen an, indem er die Capillaren unter aseptischen Kautelen ober- und unterhalb eines solchen Fleckes abschnitt und zur Aussaat brachte, und zwar mit möglichst verschiedenartigen Flecken. So fand er sieben verschiedene Spaltspilze, Diplokokken, Monokokken und Stäbchen, auch nach der Art des Wachstums verschieden; er ging aber nicht weiter in der Erforschung der von ihm gefundenen und rein kultivierten Pilze und hat so eigentlich nur festgestellt, dass es eine Anzahl von verschiedenartigen Fäulniserregern unter den Spaltpilzen gibt.

Im Jahre 1877 begann Pasteur das Studium der pathogenen Spaltpilze. Schon bei seinen Untersuchungen über die Krankheiten der Seidenraupen(73) hatte er in einem Fäulnis verursachenden Vibrio den Erreger einer dieser Krank-

heiten erkannt, war aber dann wieder zu seinen Arbeiten über die Gärung zurückgekehrt, die er nur unterbrochen hatte, als er dem Auftrage folgte, ein Mittel gegen die verheerende Epidemie der Seidenraupen zu suchen, die eine der wichtigsten Industrien Frankreichs zu vernichten drohte. Nachdem er aber seine Forschungen über die Gärung zum Abschluss gebracht hatte, wandte er sich nun einem Gebiete zu, auf das er während seiner früheren Arbeiten schon mancherlei Ausblicke getan hatte. Zuerst ging er an das Studium des Milzbrandes.(74) Hier war freilich nicht mehr viel zu entdecken, seitdem 1876 Koch in seiner klassischen Arbeit den Formenkreis und die Art der Infektion bei diesen Bazillen festgestellt hatte; was er aber noch nicht hatte ausführen können, eine sichere und jederzeit leicht benützbare Reinkultur der Bazillen zu gewinnen, das vollbrachte Pasteur jetzt mit Hilfe einer einfachen und doch noch nicht gemachten Überlegung. Bereits 1863 hatte er steriles Blut von gesunden Tieren unter den nötigen Vorsichtsmassregeln erhalten;(11) wenn er Blut von einem milzbrandkranken Tiere unter den gleichen Umständen entnähme, so könnte es, schloss er, nur Milzbrandbazillen enthalten und müsste, ausgesäet, eine Reinkultur derselben ergeben. So führte er es auch aus und fand im neutralisierten oder etwas alkalisch gemachten Urin, sowie in seiner künstlichen Nährlösung geeignete Medien für seine Bazillen. Die noch immer diskutierten Fragen: Sind die Bakterien oder andere Bestandteile des eingeimpften Blutes die Ursache der Erkrankung? und: Enthält das Blut noch andere Infektionserreger ausser den Bazillen? konnte er mit seinen Reinkulturen endgültig erledigen.

In seiner nächsten Arbeit brachte er dann Klarheit in die Verwirrung, die durch die widersprechenden Ergebnisse der Tierexperimente über Milzbrand entstanden war. Er

stellte fest, wie das schon Davaine bewiesen hatte, dass der Bazillus ein strenger Aerobier ist und bei Sauerstoffmangel abstirbt und zerfällt, während seine Sporen, wie schon Koch erwiesen hatte, eine grosse Widerstandsfähigkeit besitzen, dass dies auch der Grund sei, warum die Bazillen hauptsächlich im Blute zu finden wären, dem sauerstoffreichsten Teile des Körpers, das im übrigen durchaus keinen guten Nährboden für die Bazillen abgebe, besonders nicht im lebenden Tiere, denn die roten Blutkörperchen seien ebenfalls Lebewesen und auch bei den kleinsten herrsche der „Kampf ums Dasein". Weiterhin zeigte dann Pasteur noch die Empfindlichkeit der Milzbrandbazillen: in Nährlösungen zusammen mit anderen Aerobiern ausgesäet, können sie nicht gedeihen, auch nicht so im Tierkörper. Bei der Fäulnis, bei der die Entwicklung der Vibrionen und der Mangel an Sauerstoff die ungünstigsten Bedingungen setzen, können keine Bazillen existieren. So erklärte er den Irrtum von Jaillard und Leplat und von Signol, denn er zeigte, dass im Blut von an Milzbrand verstorbenen Tieren je nach der Zeit, die seit dem Tode verflossen ist, nur Milzbrandbazillen oder Bazillen mit Fäulnisvibrionen oder nur Vibrionen zu finden sind und demnach verschiedenartige Krankheiten erzeugen.(75) Diese Vibrionen machte er dann zum Gegenstand einer eingehenden Untersuchung.(76) Da er ihre Reinkulturen bei gewöhnlicher Aussaat schnell steril werden sah, so kam ihm der Gedanke, dass er hier wieder einmal Anaerobier vor sich habe. Der Versuch einer Kultur im Vacuum und reiner Kohlensäure-Atmosphäre gelang, während bei Sauerstoffgegenwart die Vibrionen ihre Tätigkeit einstellten und zur Sporenbildung übergingen. So verstand er, weshalb sie hauptsächlich in den serösen Flüssigkeiten, aber nur wenig im Blute vorhanden sind und von früheren Untersuchern nicht gefunden worden waren, die stets nur im Blut nach ihnen

forschten. In sterilem, zehnfach verdünntem, neutralisiertem oder etwas alkalisch gemachtem Liebigschen Fleischextrakte wuchs der „vibrion septique“ besonders gut, und hier fand Pasteur zum ersten Male, dass ein pathogener Spaltpilz je nach dem Kulturboden Gestalt, Fortpflanzungsgeschwindigkeit und Virulenz ändern kann. Bei fortgesetzter Kultur im Liebigschen Fleischextrakte nahm die Virulenz ab, während eine einmalige Passage durch Blutserum mit etwas Fibrincoagulum wieder einen sehr virulenten Vibrio hervorgehen liess und noch mehr die seröse Flüssigkeit der Bauchhöhle eines damit geimpften und getöteten Tieres. Mit dieser Entdeckung betrat Pasteur ein bis dahin nur geahntes Gebiet der Bakteriologie. Wenn er die Mikroorganismen nach Belieben in ihrer Virulenz abschwächen und verstärken könnte, so war er auch imstande, beliebig schwere und leichte Krankheiten damit zu erzeugen, und als er dann bei dem nächsten Krankheitserreger, dem er sich zuwandte, dem Hühnercholerabazillus, feststellte, dass ein einmaliges Überstehen der durch ihn verursachten Krankheit auch eine Widerstandsfähigkeit gegen eine Reininfektion gebe, hatte er die beiden Grundfragen gelöst für die Entwicklung der Lehre von der künstlichen aktiven Immunität. Zunächst kultivierte er aus Wasser und ähnlichen Flüssigkeiten einige andere Fäulniserreger.(77) So fand er einen Vibrio, der aerobisch wie auch anaerobisch leben konnte und bei subkutaner Injektion bei Meerschweinchen und Kaninchen einen heilbaren Abszess bewirkte, auch wenn er vorher abgetötet war; wurde er aber in grösserer Menge subkutan oder direkt ins Blut eingeimpft, so blieb er in seinem Wachstum nicht lokal beschränkt, sondern führte zu Metastasenbildung und meist zum Tode. Zusammen mit dem vibrion septique eingeimpft, genügte schon die subkutane Injektion, um ihn zusammen mit dem anderen in alle Gewebe zu bringen und die gebildeten

Abszesse gangränös zu machen. Mit dem Milzbrandbazillus zusammen eingeimpft, erzeugte er einen purulenten Milzbrand oder unterdrückte, wenn er in genügender Menge vorhanden war, den Bazillus und es entstand nur ein Abszess, da der Vibrio dem Bazillus den nötigen Sauerstoff entzog und doch selbst nicht streng darauf angewiesen war, aerobisch zu leben.

Der Erreger der Hühnercholera war bereits seit einigen Jahren bekannt und von Toussaint, Professor an der Veterinärschule zu Toulouse, in neutralisiertem Harn rein kultiviert worden, als Pasteur 1880 an das Studium desselben ging.(78) Urin sowie Bierhefenabsud fand er für seine Kultur ungeeignet, dagegen war neutralisierte Hühnerbouillon ein guter Nährboden. Bei der Fortpflanzung der Mikroben in diesem Medium fand Pasteur nun beinahe zufällig die Tatsachen, dass Kulturen, die über eine gewisse Zeit hinaus in derselben Nährflüssigkeit blieben, an Virulenz geschwächt wurden und durch Vergrösserung dieses Zeitraumes bis zur vollständigen Avirulenz gebracht werden konnten, und dass derartige Kulturen in ihrer einmal erreichten abgeschwächten Kraft konstant blieben, bei weiterer Kultivierung mit wieder gekürzten Intervallen. Mit derartigen Kulturen geimpfte Hühner überlebten die Krankheit, und wenn sie nicht nach der ersten Infektion nunmehr immun auch gegen die virulentesten Erreger waren, so doch sicher nach der zweiten und dritten. Bei Meerschweinchen verursachte dieser Spaltpilz nur lokale Abszesse und ebenso auch bei den teilweise immunisierten Hühnern, mit dem Abszesseiter liessen sich dann Hühner wieder infizieren und töten, wenn er ihnen subkutan oder mit der Nahrung beigebracht wurde.

Im gleichen Jahre konnte dann Pasteur noch den Staphylococcus pyogenes aus Furunkeln und osteomyelitischem Eiter in Hefen- und Hühnerbouillon rein kultivieren und

ebenso den Streptokokkus aus dem Blut und Eiter von an Sepsis puerperalis Erkrankten und Verstorbenen. Beim Wochenbettfieber fand er allerdings auch seinen eitererregenden Fäulnisvibrio wieder und konnte es nicht sicherstellen, welcher der beiden Mikroorganismen nun der eigentliche Erreger dieser Krankheit wäre.(79)

1881 kultivierte er aus dem Speichel eines an der Wutkrankheit verstorbenen Kindes einen Bazillus, der für Kaninchen und Hunde, nicht aber für Meerschweinchen und Hühner pathogen war. Nun konnte er jedoch ganz junge, nur wenige Stunden alte Meerschweinchen damit töten, und setzte er die Impfungen mit dem Blute der Getöteten auf immer ältere Tiere fort, so erstarkte der Bazillus in seiner Virulenz für diese Tiere und tötete schliesslich auch ausgewachsene. Damit hatte er aber auch zugleich an Virulenz für Kaninchen verloren, bei denen er jetzt nur mehr eine heilbare Erkrankung verursachen konnte.(80)

Von diesen Erfahrungen ging Pasteur aus, als er kurz darauf den Erreger des Schweinerotlaufes studierte und fand, dass dieser auch zugleich der Erreger einer Epidemie bei Tauben und Kaninchen sei. Durch fortlaufende Impfung von Taube zu Taube und von Kaninchen zu Kaninchen kam er schliesslich zu Stämmen von ausserordentlicher Virulenz für diese Tiere. Und als er sie dann auf ihre Infektionskraft bei Schweinen prüfte, stellte er fest, dass der an Tauben akklimatisierte Stamm noch viel bösartiger wäre wie der gewöhnliche, während der in den Kaninchen fortgezogene die gesuchte, für Schweine wenig virulente Art darstellte, mit deren Hilfe dann Pasteur eine brauchbare Schutzimpfung durchführen konnte.(81)

Die wichtigsten Erfolge mit seinen Reinkulturen konnte Pasteur beim Milzbrand erreichen, dessen Studium er während seiner anderen Forschungen nicht aufgegeben hatte.(82) Da

er schon gefunden hatte, dass das einmalige Überstehen dieser Krankheit eine Immunität verleiht, so brauchte er nur eineabgeschwächte Kultur der Milzbrandbazillen zu verimpfen, um die Herden von dieser dezimierenden Krankheit zu befreien. Aber seine bisherigen Methoden versagten bei den Versuchen, den Bazillus in seiner Kraft abzuschwächen, denn sobald er ihn unter ungünstige Bedingungen brachte, ging er zur Sporenbildung über, und die Sporen widerstanden den äusseren Einflussen leicht. Endlich fand er doch einen Weg zum vorgesetzten Ziele. Wenn er den Bazillus nun unter Temperaturen kultivieren könnte, bei denen ein Wachstum gerade noch möglich ist und doch keine Sporenbildung stattfindet, also bei 16° und bei 42—43°? Und wirklich zeigten sich bei 42—43° acht Tage lang im Wasser oder vier Wochen lang in Hühnerbouillon gehaltene Kulturen bereits nicht mehr virulent, und damit war die Vaccinierung ermöglicht, denn die Sporen dieser Bazillen wuchsen zu neuen, avirulenten Stäbchen heran.

Was man auch ohne feste Nährböden auf dem Gebiete der Reinkultur erreichen konnte, hat Pasteur nach meiner Ansicht am besten gezeigt, als er den Milzbrandbazillus aus dem Boden rein züchtete, ein Versuch, den er, wie viele andere, zum Beweise seiner „Regenwürmertheorie“ für die Entstehung der Milzbrandepidemien unternahm.(83) Er wusch den Boden mit Wasser aus, brachte die Niederschläge des Waschwassers, nachdem er sie 20 Minuten bei 90—95° gehalten hatte, auf Marmor- oder Kieselstücke in ein Rohr, das unten mit Luftlöchern versehen und oben offen war und so bei dauernder Ventilation eine möglichst grosse Oberfläche seines Inhaltes der vorbeistreichenden Luft darbot. So wurde der Apparat einige Stunden bei 30—35° gehalten, dann wurden die Steine mit wenig Waschwasser gewaschen und dieses in Bierhefenbouillon gebracht und bei 42—43° ge-

halten. Die Milzbrandsporen keimten bei dieser Temperatur nicht, wohl aber alle anderen, und wenn dann einige Stunden auf 75° erhitzt wurde, ging alles bis auf die Milzbrandsporen zu Grunde, die dann bei erneuter Kultur auswuchsen.

Mit der Entdeckung der festen Nährböden zum Zwecke der Isolation durch Koch findet dann 1881 die Entwicklung der Reinkulturmethoden ihr Ende. Mit dieser Methode wurden alle bisherigen, mehr oder weniger unsicheren überflüssig gemacht, seit ihrer Entdeckung und mit ihrer Hilfe entwickelte sich dann bald die Bakteriologie mit einer ungeahnten Schnelligkeit. Die zahlreichen Erfolge, die sich in kurzer Zeit einstellten, waren zugleich ein Beweis für die Richtigkeit des Prinzips von Koch, als er mit seinen festen Boden eine Isolation der Keime erreichen wollte. Freilich hatte Isolation auch bei früheren Versuchen mit festen Nährböden stattgefunden, ja nur durch sie waren die Kulturen geglückt, die bei Anwendung von Flüssigkeiten regelmässig misslangen, aber es ist seltsam, dass sich niemand darüber klar wurde, weshalb es so sei, und dass erst nach so langer Zeit sich Koch diese Frage zum ersten Male vorlegte. Im Laboratorium von F. Cohn hatte er die Pigmentbakterienkulturen auf Kartoffeln gesehen und wahrscheinlich waren sie der Ausgangspunkt für seine Entdeckung. So benutzte er zu Beginn die Kartoffel als Kulturboden und fand sie auch dazu für mancherlei Keime, wie z. B. für Heu- und Milzbrandbazillen, geeignet, aber viele andere wollten darauf nicht wachsen, und da er keinen Universalnährboden fand, so beschränkte er sich darauf, die bekannten flüssigen in feste überzuführen. Als ein geeignetes Mittel dazu, besser als Hausenblasengallerte und ähnliches, zeigte sich die Gelatine. Seine erste Impfmethode war noch eine andere als das heute benutzte Verfahren,(84) er goss die Gelatine auf Objekt-

träger aus und impfte darauf mit einer Nadel in Form von Querlinien. War diese erste Methode auch noch nicht so einwandfrei, dass alle eingeimpften und zu Kulturen aufgehenden Keime Reinkulturen wurden, so wies er doch schon in seiner ersten Veröffentlichung auf die Verbesserung hin, die Keime durch Verrühren in der flüssigen Gelatine besser zu verteilen. Den besten Beweis für die Vorzüge seines neuen Verfahrens lieferte Koch selber, indem er damit den schon lange gesuchten Erreger der Tuberkulose fand und rein kultivierte.(85)

Damit will ich schliessen. Es wurden zwar noch einige neue Nährböden gefunden, von denen besonders die Einführung des Agar-Agar durch Frau Hesse wichtig ist, es wurden auch noch einige, für besondere Zwecke geeignete Methoden erdacht, aber im allgemeinen arbeiten wir ja noch heute nach den Kochschen Vorschriften, und die zahlreichen Entdeckungen, die alsbald nach ihrer Einführung von Koch und seinen Schülern gemacht wurden und die ich hier nicht mehr beschreiben will, beweisen seine Vorzüglichkeit. Freilich hat auch diese Methode, wie alles andere, ihre Grenzen, die immer fühlbarer werden, seitdem wir den Kreis des damit Erreichbaren fast umschritten haben. Die Krankheitserreger, die aus noch unbekannten Gründen auf unseren Nährböden nicht wachsen wollen, müssen neuen Methoden der Zukunft überlassen bleiben.

Herrn Obermedizinalrat Professor Dr. Gruber möchte ich zum Schluss meinen Dank aussprechen für die Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertation und bei der zum Teil recht schwierigen Beschaffung der Litteratur.

Litteratur-Verzeichnis.

1. Spallanzani, Physikalische und Mathematische Abhandlungen, Leipzig, 1769.
2. Annales de Chimie, Bd. 76 (1810), S. 245.
3. Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. 89 (1854), S. 232.
4. Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. 109 (1859), S. 35.
5. Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. 115 (1860), S. 75.
6. Comptes rendues, Bd. 45, S. 913.
7. Comptes rendues, Bd. 46, S. 615.
8. Comptes rendues, Bd. 48, S. 337.
9. Annales de Chimie et de Physique, III. Série, Bd. 64, S. 1.
10. Comptes rendues, Bd. 50, S. 849 und Annales de Chimie et de Physique, III. Série, Bd. 64.
11. Comptes rendues, 23. IV. 1863 und Etudes sur la bière, 1876, S. 46.
12. Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. 117 (1861), S. 273.
13. Virchows Archiv, Bd. 54 (1872), S. 396.
14. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Vol. 164 (1874), S. 457.
15. Quaterly Journal of Microscopical Science, 1873, S. 380.
16. Giornale Dell' J. R. Istuto Lombardo, N. Serie, Bd. III (1851), S. 143.
17. Bulletin de la société chimique de Paris, Bd. 32, S. 126.
18. Annuaire de l'Observatoire de Montsouris pour l'an, 1886, S. 477.
19. Deutsche Zeitschrift für praktische Medizin, 1877, Nr. 20.
20. Berichte über die Verhandlungen der Akademie der Wissenschaften zu Berlin; 1848: S. 349, 354, 359, 462; 1849: S. 101; 1850: S. 5, 215, 364; 1851: S. 198, 271.

21. Memoria storico-naturale sull'arrosmento straordinario di alcune sostanze alimentose, osservato nella provincia di Padova, l'anno 1819. letta all'Ateneo di Treviso, nella sera Aprile 1820. Venesia 1824.
22. Beiträge zur Mykologie von Georg Fresenius, Heft II, S. 78.
23. Journal für praktische Chemie. Bd. 99, S. 385.
24. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. I, Heft II, S. 127.
25. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. III, Heft I, S. 105.
26. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. III, Heft II, S. 187.
27. Flora 1857, Nr. 27, 28. — Bericht der Versammlung der Deutschen Naturforscher und Ärzte in Königsberg 1860, S. 49, 252. — Hedwigia 1867, S. 177.
28. Botanische Zeitung 1860, Nr. 5 und 6; 1865, S. 348; 1869, S. 233 u. s. w.
29. Annales des sciences naturelles, Serie III, Bd. 12, Serie IV, Bd. 2.
30. Monatsbericht der Kgl. Akademie der Wissenschaften zu Berlin 1865, 1866, S. 205. — Über Schimmel und Hefe von A. de Bary 1869, S. 34, 48. — Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pilze von A. de Bary, Reihe I und II.
31. Untersuchungen über niedere Pilze von C. v. Naegeli, 1882 S. 12.
32. Botanische Untersuchungen über die Alkoholgärungspilze von M. Reess.
33. Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze von O. Brefeld, Heft IV (1881), S. 1,
34. Annales des Sciences naturelles, V. Série, Botanique, Bd. 17, S. 263.
35. Untersuchungen über niedere Pilze von C. v. Naegeli, 1882.
36. Comptes rendues, Bd. 45, S. 913, Annales de Chimie et de Physique, Ser. III, Bd. 52, S. 404.
37. Comptes rendues, Bd. 46, S. 615.
38. Virchows Archiv, Bd. XI, S. 132, Bd. XIV, S. 432.
39. Recueil de médecine véterinaire, 1860, S. 726.
40. Comptes rendues, Bd. 52, S. 344.
41. Comptes rendues, Bd. 52, S. 1260.

42. Comptes rendues, Bd. 56, S. 416.
43. Comptes rendues, Bd. 58, S. 210.
44. Comptes rendues, Bd. 80, S. 452.
45. Études sur la biére par M. L. Pasteur, Paris, 1876.
46. Études sur la biére, S. 107. — Études sur le vinaigre 1868. — Mémoire sur la fermentation acétique. — Comptes rendues, Bd. 54, S. 265; Bd. 55, S. 29.; Bd. 75, S. 784.
47. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. I, S. 31; Bd. IV, S. 107, 207, 409; Bd. X, S. 161, 222; Bd. XI, S. 311; Bd. XII, S. 225, 231.
48. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. XI, S. 81.
49. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. XVII, S. 1. — Prager medizinische Wochenschrift, 1877, Nr. 42, 43. — Eulenbergs Real-Encyklopädie, Bd. XIV, S. 130.
50. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. I, Heft I, S. 109.
51. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. II, Heft II, S. 249, 176.
52. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. II, Heft II, S. 277.
53. Sitzungsbericht der mathem.-naturw. Klasse der Kaiserl. Akademie der Wissenschaften zu Wien, Bd. 74, Abteil. III, S. 123.
54. Virchows Archiv, Bd. 50, S. 550.
55. Berliner klinische Wochenschrift, 1870, S. 8.
56. Zur Kenntnis der bakterischen Mykosen von C. J. Eberth, Leipzig, 1872.
57. Botanische Zeitung, 1876, S. 609; 1880, S. 481.
58. Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze von O. Brefeld, Heft IV, S. 36.
59. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten von A. Prazmowski, Leipzig, 1880.
60. Berichte der deutsch-chemischen Gesellschaft, Bd. XI, S. 42, 1890.
61. Quaterly journal of Microscopical science, 1873, S. 380. Transactions of the Royal Society of Edinburgh, Vol. 27 (1876), S. 313.

62. Transactions of the Pathological Society of London, Bd. 29 (1878), S. 425.
63. Untersuchungen über niedere Pilze von C. v. Naegeli, S. 120 u. s. w.
64. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie, Bd. I, S. 205.
65. Untersuchungen über niedere Pilze von C. v. Naegeli, S. 12.
66. Das Mikroskop von C. v. Naegeli und S. Schwendener, II. Aufl., S. 644.
67. Die niederen Pilze von C. v. Naegeli, München, 1877, S. 17.
68. Untersuchungen über die Ätiologie der Wundinfektionskrankheiten von Robert Koch, Leipzig, 1878.
69. Comptes rendues, Bd. 86, S. 605.
70. Bulletin de la société chimique de Paris, Bd. 32, S. 126, 127.
71. Les organismes vivants de l'atmosphére par M. P. Miquel, S. 182.
72. Bulletin de la société botanique de France, 1879, Bd. 26, S. 25.
73. Etudes sur la maladie des vers à soie par M. L. Pasteur, Paris, 1870.
74. Comptes rendues, Bd. 84, S. 900.
75. Comptes rendues, Bd. 85, S. 101. — Bulletin de l'Académie de Médecine, 1877, S. 781.
76. Bulletin de l'Académie de Médecine 1878, S. 432.
77. Comptes rendues, Bd. 85, S. 101.
78. Comptes rendues, Bd. 90, S. 239, 952. — Bulletin de l'Académie de Médecine, 1880, S. 121, 390, 1119.
79. Comptes rendues, Bd. 90, S. 1033. — Bulletin de l'Académie de Médecine, 1880, S. 435.
80. Comptes rendues, Bd. 92, S. 159. — Bulletin de l'Académie de Médecine, 1881, S. 94, 717.
81. Comptes rendues, Bd. 95, S. 1120; Bd. 97, S. 1163. — Bulletin de l'Académie de Medécine, 1882, S. 1438; 1883, S. 1359.
82. Comptes rendues, Bd. 87, S. 47; Bd. 91, S. 86, 315, 531; Bd. 92, S. 429, 666, 1378. — Bulletin de l'Académie de Médecine, 1880, S. 682, 983; 1881, S. 782; 1883, S. 509.

83. Bulletin de l'Académie de Médecine, 1881, S. 301.
84. Mitteilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Berlin, 1881, S. 1.
85. Mitteilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. II, 1884, S. 1.
86. Mitteilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. I, 1881, S. 303.
87. Lehrbuch der Agrikulturchemie in 40 Vorlesungen von Dr. Adolf Mayer, IX., X. Lieferung.
88. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. I, Heft II, S. 127.
89. Zentralblatt für Bakteriologie, Bd. XIV (1893), S. 316.
90. Comptes rendues, Bd. 57, S. 220, 351, 386.
„ „ Bd. 59, S. 393, 429.
„ „ Bd. 60, S. 1296.
„ „ Bd. 61, S. 334, 368, 523.
„ „ Bd. 68, S. 193, 271.
91. Virchows Archiv, Bd. 28, S. 157.
92. Comptes rendues, Bd. 56, S. 1225.

Lebenslauf.

Ich, Siegfried Simon, wurde am 8. Juni 1882 in Magdeburg als Sohn des Kaufmanns Gotthold Simon geboren. Im September 1900 erhielt ich das Reifezeugnis des Realgymnasiums zu Magdeburg. Dann studierte ich vier Semester Naturwissenschaften, je zwei in Berlin und München, und acht Semester Medizin, davon fünf in München und drei in Berlin, und machte im Winter 1906 in München die medizinische Approbationsprüfung, die ich am 5. Dezember 1906 beendete. Vom 1. I. bis 31. III. 1907 war ich als Medizinalpraktikant in der chirurgischen Abteilung des v. Haunerschen Kinderspitals bei Professor Herzog, vom 1. IV. bis 31. IX. in der Kinder-Poliklinik bei Professor Seitz und vom 1. X. bis 31. XII. 1907 in der laryngologischen Poliklinik und der Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten tätig.